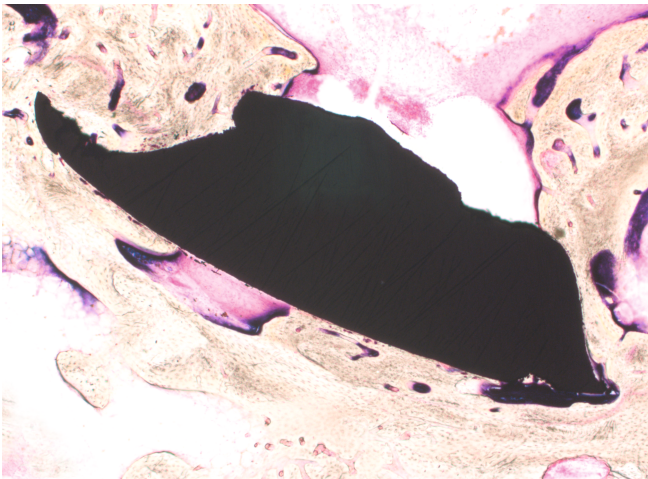


Experimentelle Untersuchung zur Biokompatibilität offenporiger metallischer Implantatstrukturen mit bioaktiver Kalzium-Titanat-Reaktionsschicht unter besonderer Berücksichtigung des Knochenaufbaus

Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung

Lucie Katharina Domenica de Azevedo



Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Experimentelle Untersuchung zur Biokompatibilität
offenporiger metallischer Implantatstrukturen mit
bioaktiver Kalzium-Titanat-Reaktionsschicht unter
besonderer Berücksichtigung des Knochenaufbaus**

Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des
Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Lucie Katharina Domenica de Azevedo

aus Würzburg

Gießen, 2016

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der
Justus- Liebig- Universität Gießen und dem Labor für Experimentelle
Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Christian Heiß

Gutachter: Univ.- Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Schnettler

Gutachter: Professor Dr. Melzer

Tag der Disputation: 12. 12. 2017

Für meine

Mutter und Großmutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1. Einführung	7
1.2. Zielsetzung	9
1.3. Entwicklung, Funktion und Aufbau des menschlichen Knochens	10
1.3.1. Zellen des humanen Knochens	12
1.3.2. Osteocalcin und Osteopontin	14
1.4. Fraktur	15
1.4.1. Definition und Klassifikation nach AO	15
1.4.2. Frakturheilung	17
1.5. Das ideale Knochenersatzmaterial	19
1.6. Biologische Wertigkeit	19
1.7. Arten und Einsatzgebiete der verschiedenen Knochenersatzmaterialien	20
1.7.1. Natürliche Knochenersatzmaterialien	21
1.7.1.1. Autologe Knochenersatzmaterialien:	21
1.7.2. Allogene Knochenersatzmaterialien	22
1.7.2.1. Xenogene Substitution	22
1.7.2.2. Wachstumsfaktoren	23
1.7.3. Artificielle Knochenersatzmaterialien	24
1.7.3.1. Kalziumphosphatkeramik	24
1.7.3.2. Bioaktive Gläser und Glaskeramiken	26
1.7.3.3. Metalle	26
1.7.3.4. Polymere	27
1.7.3.5. Zemente	28
1.7.4. Alloplastische Knochenersatzmaterialien	29
1.8. Einsatzgebiete für Knochenersatzmaterialien	29
1.8.1. Benigne und maligne Knochentumore	30
1.8.2. Osteomyelitische Herde	31

Inhaltsverzeichnis	2
2. Material und Methoden.....	32
2.1. Versuchstiere	32
2.2. Zu testendes Material: Kalzium-Titanat-Implantate.....	32
2.3. Versuchsdurchführung	33
2.3.1. Randomisierung	33
2.3.2. Haltung und Fütterung.....	33
2.3.3. Präoperative Prämedikation	34
2.3.4. Anatomie des OP-Gebietes.....	34
2.3.5. Einbringen der Implantate	34
2.3.6. Postoperativ	36
2.3.7. Polychrome Sequenzmarkierung	37
2.3.8. Euthanasie und Materialentnahme	38
2.4. Schliffherstellung mittels Trenn-Dünnschliff-Technik	41
2.4.1. Exakt-Trennschleifsystem	41
2.4.2. Technovit9100Neu und Exakt-Mikroschleifsystem 400 CS.....	43
2.5. Histologische Bearbeitung.....	46
2.5.1. Färbung mit Toluidinblau	46
2.5.2. Alkalische Phosphatase	47
2.5.3. Nachweis von Alpha-Smooth-Muscle-Actin (α -SMA).....	49
2.5.4. Foto-Dokumentation histologischer und immunhistologischer Schnitte .	50
2.6. Messverfahren	51
2.6.1. Histomorphometrie	51
2.6.2. Statistik	53
2.7. Molekularbiologie	53
2.7.1. RNAlater und RNA-Isolation.....	53
2.7.2. Reverse Transkription	54
2.7.3. Qualitative PCR und Gelelektrophorese	55
2.7.4. Rt-PCR (Real-time-PCR)	55
2.8. Biomechanik	56

3. Ergebnisse	59
3.1. Makroskopische Evaluation	59
3.2. Mikroskopische Evaluation	59
3.2.1. Osteointegration	59
3.2.2. Knochenaufbau	62
3.2.3. Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase	64
3.2.4. Immunhistochemie: Anti- α -SMA	71
3.2.5. Fluoreszenz: Alizarin	72
3.3. Statistik und Histomorphometrie	81
3.3.1. Knochenmenge	81
3.3.2. Toluidinblau	84
3.3.3. Alkalische Phosphatase	85
3.3.4. Alizarin	86
3.3.5. rT-PCR	88
4. Diskussion	90
5. Zusammenfassung	102
5.1. Deutsch	102
5.2. Summary	103
6. Literaturverzeichnis	105
7. Danksagung	123
8. VITA	124
9. Publikationen	127
10. Erklärung	131

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: (Foto) Unfunktionalisiertes Implantat.....	35
Abbildung 2: (Foto) Eröffnung des OP-Gebietes: Spaltung der Fascia genu	35
Abbildung 3: (Foto) Entnahme des Bohrzylinders mit einem Extraktor	36
Abbildung 4: (Foto) Verschluss der Wunde	36
Abbildung 5: polychrome Sequenzmarkierung	37
Abbildung 6: (Foto) Femurkondylen nach Trennung von der Diaphyse	40
Abbildung 7: (Foto) Femurkondyle mit Implantat (Pfeil)	40
Abbildung 8: (Foto) Exakt Trennschleifsystem.....	42
Abbildung 9:(Foto) Femurkondyle mit freigelegtem Implantat.....	42
Abbildung 10: Schema Implantat.....	43
Abbildung 11: (Foto) Knochenschliff.....	44
Abbildung 12: (Foto) Exakt- Trennschleifsystem310CL	45
Abbildung 13:(Foto) Zuschnitt Präparat	45
Abbildung 14a und b: Histologie: Toluidinblau	47
Abbildung 15: (Foto) Rüttler	48
Abbildung 16: Histologie: Alkalische Phosphatase	48
Abbildung 17: Histologie: Immunhistochemie Anti- α -SMA -AK	50
Abbildung 18: Histologie: Fluoreszenz.....	52
Abbildung 19: Histologie: Fluoreszenz.....	52
Abbildung 20: Biomechanik: push-out	57
Abbildung 21: Biomechanik: push-out	58
Abbildung 22: Biomechanik: push-out	58
Abbildung 23: Histologie: Toluidinblau	60
Abbildung 24: Histologie: Toluidinblau	60
Abbildung 25: Histologie: Toluidinblau	61
Abbildung 26: Histologie: Toluidinblau	63
Abbildung 27: Histologie: Toluidinblau	63
Abbildung 28:Histologie: Toluidinblau	64
Abbildung 29: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase	65
Abbildung 30: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase	66
Abbildung 31: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase	66
Abbildung 32: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase	67
Abbildung 33: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase	67
Abbildung 34: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase	68
Abbildung 35: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase	68
Abbildung 36: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase	69
Abbildung 37: Histologie: Immunhistochemie Anti- α -SMA -AK	71
Abbildung 38: Histologie: Immunhistochemie Anti- α -SMA -AK	72
Abbildung 39: Histologie: Fluoreszenz.....	76
Abbildung 40: Histologie: Fluoreszenz.....	76
Abbildung 41: Histologie: Fluoreszenz.....	77
Abbildung 42: Histologie: Fluoreszenz.....	77
Abbildung 43: Histologie: Fluoreszenz.....	78
Abbildung 44: Histologie: Fluoreszenz.....	78
Abbildung 45: Histologie: Fluoreszenz.....	79

Abbildung 46: Histologie: Fluoreszenz.....	79
Abbildung 47: Histologie: Fluoreszenz.....	80
Abbildung 48: Statistik.....	81
Abbildung 49: Statistik.....	82
Abbildung 50: Statistik.....	83
Abbildung 51: Histomorphometrie: Toluidinblau	84
Abbildung 52: Histomorphometrie: Alkalische Phosphatase	85
Abbildung 53: Histomorphometrie: Fluoreszenz Alizarin.....	86
Abbildung 54: Statistik.....	87
Abbildung 55: Statistik.....	87
Abbildung 56: Statistik.....	88
Abbildung 57: Statistik.....	89
Abbildung 58: a.-p. Röntgenbild	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation offene Frakturen.....	16
Tabelle 2: Geschlossene Frakturen	16
Tabelle 3: Klassifikation Knochenersatzmaterialien nach Rueger (1992):.....	20
Tabelle 4: Einteilung Knochenersatzmaterialien nach HEISS et al. 2008	28
Tabelle 5: Osteolysen Plasmozytom nach DEICHER (1997):.....	31
Tabelle 6: Einteilung der Versuchstiere	38
Tabelle 7: Knochenscheiben	43
Tabelle 8: Einbettung in Technovit9100Neu	44
Tabelle 9: Primer für qualitative und quantitative PCR.....	54
Tabelle 10 Messwerte Toluidinblau	62
Tabelle 11 Messwerte alkalische Phosphatase	70
Tabelle 12 Messwerte Knochenneubildungsrate	70
Tabelle 13 Messwerte Alizarin.....	74
Tabelle 14: Vergleich der Mittelwerte.....	83

1. Einleitung

1.1. Einführung

Führen Traumen oder systemische Knochenerkrankungen zu Frakturen im menschlichen Körper, kommt in 10 % (SCHNETTLER et al. 2004) oder sogar in 15 % der Fälle (TSCHERNE et al. 1996) Knochenersatz zum Einsatz. Allein in den USA fallen über 6,5 Millionen Frakturen pro Jahr an, davon bedürfen über 550.000 einer Substitution des Knochendefektes (ROSHAN et al. 2011). Chirurgen transplantieren Knochen sogar zehn Mal häufiger als andere transplantierbare Organe (SUTHERLAND et al. 2005). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Knochen das zweithäufigste transplantierte humane Material nach Blut ist (MURUGAN 2005; HEINEMANN, 2011; BHATT, 2012; CAMPANA, 2014). Die Indikation für die Substitution von Knochen oder Ersatzmaterial ist unter anderem bei Überbrückung von Trümmerzonen, schweren Knochentraumen, größeren Knochendefekten, nach der Resektion von Tumoren, Pseudarthrosen, osteomyelitischen Herden, Umstellungsosteotomien sowie Arthro- und Spondylodesen gegeben (TRENTZ, 1986).

Gerade bei Tumorresektionen ist es für den rekonstruktiv tätigen Chirurgen schwierig, ein befriedigendes Ergebnis zu erzielen (GRADINGER et al. 2010) sowie osteolytische Herde adäquat zu versorgen. Hinzu kommt, dass 30 % der Tumore bevorzugt in den Wirbelkörper metastasieren und ebenso 10 % der Knochentumore in der Wirbelsäule lokalisiert sind (PILGE et al. 2011). Auch Plasmozytome, hierbei handelt es sich um maligne Knochentumore, metastasieren in 51 % bevorzugt in die Wirbelsäule (PEEST et al., 1993) und erfordern einen Knochenersatz, der vor allem eine schnelle Primärstabilität gewährleisten soll und den Patienten vor massiven Schmerzen bewahrt.

Doch muss hier darauf hingewiesen werden, dass die chirurgische Therapie allein- der Kombination aus Radiotherapie und dekomprimierenden Chirurgie unterlegen ist (PATCHELL, 2005). Muss nun ein defekter Knochen substituiert werden, so stehen dem Kliniker neben den Implantaten vorrangig die Eigen- und Fremdspende (autologe bzw. allogene Substitution) des zu ersetzenden Defektes zur Verfügung. In der Hälfte der Fälle jedoch liegen erschwerte Bedingungen für eine autologe Substitution vor, die eine Eigenspende unmöglich machen. Sei es durch Osteoporose (BARTEL, 2011) oder Frakturen, welche auf einen Tumor zurückzuführen sind und den Operateur zwingen, eine Fremdspende oder Implantate zu nutzen. Jährlich werden weltweit bis zu 800 Mio. US-Dollar für biologische Knochenersatzmaterialien ausgegeben (KAIRE, 2013).

Doch obwohl der Bedarf an Knochenersatz steigt, sinkt hierzu proportional die Spenderbereitschaft (KOMIYA et al. 2003). Daher ist der Kliniker gezwungen auf andere Knochenersatzmaterialien zurückzugreifen, um der stetig steigenden Nachfrage gerecht zu werden und gleichzeitig das Infektionsrisiko zu minimieren. Die Fremdspende ist zwar osteokonduktiv (wirkt als Leitgerüst), jedoch ist ihr Vorkommen limitiert. In der Regel ist sie nicht osteoinduktiv (stimuliert Knochenbildung) oder osteogenetisch (Fähigkeit Knochen zu bilden). Doch selbst wenn die Spendenzahlen den Bedarf an Ersatz decken würden, muss angemerkt werden, dass analog zu Bluttransfusionen oder Blutderivaten die Fremdspende Gefahren, wie die Übertragung von hochinfektiösen Krankheitserregern oder Tumoren, (SCHNETTLER, 2004; Laurencin et al. 2006) mit sich bringt. Dabei wird für die Hepatitis C eine Übertragungsrate von 1:10.000-50.000 und für Hepatitis B eine von 1:10.000 angegeben (BÖRNER, 1985). Hierzu müssen dann, um eine Eliminierung der Keime zu erzielen, Konservierungs- bzw. Desinfektionsverfahren angewendet werden, welche wiederum die biologische Wertigkeit einschränken und somit die natürlichen Integrationsprozesse in den Empfängerknochen erschweren sowie verzögern oder gar verhindern (HERR, 1997). Wählt der Operateur nun ein künstliches Implantat aus Mangel an eigener Knochensubstanz oder fehlender Spendenbereitschaft, so sollte es eine hohe biologische Wertigkeit besitzen. Bis dato gibt es noch kein Implantat welches alle fünf biologischen Kriterien (Osteokonduktion, -induktion, -genität, Biomechanik und –kompatibilität, Kapitel 1.5.) erfüllt. Es ist daher die Aufgabe gegenwärtiger Forschung, ein Implantat zu entwickeln, welches alle Kriterien erfüllen kann.

Das Implantat sollte eine sofortige Primärstabilität bieten, um eine lange Hospitalisierung und Immobilisation des Patienten zu vermeiden (FROSCH et al. 2002) und zum anderen wieder Lebensqualität (HOVY, 2001) im Sinne einer Schmerzfreiheit zu ermöglichen. Schon Julius Wolff erkannte 1892, dass sich der Knochen lebenslänglich den Erfordernissen bei Belastung anpasst, wenn „über längere Zeit die physiologische Belastung entzogen (wird), kommt es zur Inaktivitätsatrophie -Knochenschwund im Sinne des Wolff-Gesetzes“ (JACOB, 2011). Auch Els (1920) schloss folgerichtig aus einer Kasuistik eines vierjährigen Jungen, der eine autologe Transplantation in den Femurschaft aufgrund eines hämorrhagischen Sarkoms erhielt, dass es von Belang ist, ob der Patient nach Erhalt des Knochenersatzes wieder vollständig mobil ist. Dieses Ergebnis „stellt nichts anderes dar, als den Erfolg der physiologischen Reaktion des Gewebes auf den trophischen Reiz der Funktion, die von Anfang an die rein chirurgische Maßnahme unterstützt und unterstützen muss. Die möglichst frühzeitige Beanspruchung der Extremität, speziell die Belastung, ist der Hauptfaktor um eine dem späteren

statischen Verhältnissen angepasste Knochenstruktur zu erzielen.“ KAACK (2000) beschrieb sogar, dass längere Liegezeiten häufiger zu einem letalen Ausgang nach Implantat-Einsatz führen. Daher ist es wichtig, den Knochendefekt mit einem Implantat zu versorgen, welches eine gute Primärstabilität ermöglicht, dem Knochen jedoch einen Anreiz zur Knochenneubildung lässt.

Dass Kalzium als Voraussetzung für ein optimales knöchernes Remodelling fungiert - nicht zuletzt weil Knochen als das Hauptreservoir für diesen Mineralstoff gilt- (WEINER et al. 1998), ist aus zahlreichen Studien hinreichend bekannt und fand somit auch bei dem vorliegenden Forschungsprojekt Einzug. Es ist vollständig resorbierbar und dient bis zur völligen Defektheilung als Substitutor (FLAUTRE et al. 1999; WENISCH et al. 2003; SCHNETTLER et al. 2006).

JUNG et al. (2010) zeigte, dass losgelöstes Kalzium eine Aktivierung der knochenassoziierten Proteine OPN (Osteoprogenitorprotein) und BSP (Bone-specific Protein) durch die L-Typ-Kalzium-Kanäle und Kalzium-abhängige Proteinkinase (CAMK2) auslöst, was zu einer Differenzierung der Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten führt. Darüber hinaus erhöhen Hydroxylapatit und Kalzium die Expression von alkalischer Phosphatase (QU et al. 2001; JUNG et al. 2010). Die alkalische Phosphatase ist ein zelleigenes Enzym der Osteoblasten und ein indirekter Indikator für deren Aktivität und Differenzierung (LÜLLMANN-RAUCH, 2012).

1.2. Zielsetzung

Um den Einfluss von Kalzium auf die Aktivität der Osteoblasten und die Osteointegration des Implantates zu eruieren, wählten wir eine Funktionalisierung mittels Kalzium-Titanat. Die offenporigen Implantate aus einer Titanlegierung (Ti6Al7Nb) wurden im Gießerei-Institut der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen gegossen. Das Gießverfahren sollte die Möglichkeit bieten, Implantate in verschiedenen Größen und Formen, ähnlich eines Baukastens, nach Bedarf zu erstellen. Um das gegossene Material wurde anschließend, durch die Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) in Berlin, mit Hilfe eines Salzbadess eine Reaktionsschicht aus Kalzium-Titanat erzeugt (BERGER et al. 2003). Über oxidative Vorgänge wird das Kalzium in das bioinerte Titanimplantat gebunden und kristallisiert zu Kalzium-Titanat (PLOSKA et al. 2003). Dies ermöglicht ein kontinuierliches Abdiffundieren der Kalzium-Ionen in den Knochen und erhöht somit die Biokompatibilität des Testmaterials. Die Prüfung und Charakterisierung (Mikrostruktur und mechanische Testung) des Materials wurde an der Universität Siegen und der Fachhochschule Osnabrück durchgeführt. Auch konnte durch

die zylindrische Form eine Reproduzierbarkeit und Standardisierung der Defekte gewährleistet werden, die mittels des Diamond-Bone-Cutting-Systems in den Schaff-Femur ohne Hitzenekrosen gesetzt wurden.

In der vorliegenden Arbeit werden die Kalzium-Titanat-Implantate in vivo im Schafstiermodell evaluiert. Die Daten sind weitgehend auf den Menschen übertragbar, da man bei den ovinen Knochen, im Gegensatz zu den üblichen zur Verfügung stehenden Kleintieren wie Maus, Ratte oder Kaninchen, einen ähnlichen Knochenstoffwechsel vorfindet (WISSING et al. 1990; FFLAUTRE et al. 1999; KEYDEL, 2001).

Ziel dieser tierexperimentellen Arbeit war es, eine detaillierte Charakterisierung zwischen osteoblastischer Aktivität und dem beschichteten zylindrischen Implantat, histologisch, elektronenmikroskopisch und rasterelektronenmikroskopisch auf zellulärer Ebene, in Bezug auf den Aufbau, darzustellen, um besonderes Augenmerk darauf zu legen, ob eine Beschichtung mit Kalzium-Titanat zu einer besseren Osteointegration von nicht-biologischem Material führt. Mittels der polychromen Sequenzmarkierung (Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen) kann die Knochenneu- und umbildung chronologisch nachvollzogen und somit indirekt nachgewiesen werden, ob eine Funktionalisierung des Titans und die offenporige Struktur tatsächlich die Biokompatibilität erhöht und eine Osteointegration stattgefunden hat.

1.3. Entwicklung, Funktion und Aufbau des menschlichen Knochens

In der sechsten Embryonalwoche entsteht aus osteo- und chondrogenen Mesenchymverdichtungen des mesodermalen Blattes (OFFERMANN et al. 2004) der drei Keimblätter das Knochengewebe. Auf zwei Arten kann dadurch Knochen gebildet werden: Entweder verknöchern besagte Verdichtungen direkt (z.B. bei der Clavicula oder den Schädel- und Gesichtsknochen), was als desmale oder direkte Ossifikation bezeichnet wird, oder das Mesenchym entwickelt sich zunächst zu Knorpelgewebe und wird erst im weiteren Verlauf zu Knochen umgewandelt. Letztere Form wird entsprechend als indirekte oder auch chondrale Ossifikation bezeichnet. Wird der Knorpel direkt in Knochengewebe umgewandelt, so spricht man von enchondraler Ossifikation, wird er aber durch Aufschichtung von Knochensubstanz auf Knorpelgewebe gebildet, spricht man von der perichondralen Ossifikation. Beispielsweise geschieht im Röhrenknochen das Längenwachstum enchondral und das Dickenwachstum vorwiegend perichondral (KUSTER et al. 2011).

Der Knochen stellt -neben dem Knorpel- den wichtigsten Bestandteil des menschlichen Stützgewebes dar. Zusammen mit der quergestreiften Skelettmuskulatur bildet der Knochen den Bewegungsapparat und entspricht seinem passiven Anteil, wohingegen die Muskulatur den aktiven Anteil darstellt. Aufgrund einer speziellen Zusammensetzung seiner Knochenmatrix ist der Knochen gleichzeitig sowohl druckfest, was im Detail durch den hohen Gehalt an Hydroxylapatit (= Kalziumphosphat-Kristalle) erreicht wird, als auch elastisch. Letzteres wird durch eine trajektorelle Anordnung einer seiner Untereinheiten, den Kollagenfibrillen, gewährleistet (Niethard et al. 2014). Neben der Funktion als Protektor der zu schützenden Weichteile, wie Gehirn und Rückenmark oder den Organen des Brustkorbes und des kleinen Beckens, ist der Knochen des Weiteren über sein Knochenmark an der Blutbildung beteiligt. Schließlich ist als weitere zentrale Rolle die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase des Körpers zu nennen.

Knochenmakrostruktur

Im Säugetier lässt sich der Knochen in zwei Unterformen antreffen: dem Geflecht- und dem Lamellenknochen. In der Adoleszenz ist vorwiegend Lamellenknochen vorzufinden. Dieser lässt sich weiter in einen spongiösen und kompakten Anteil kategorisieren. Letzterer findet sich als sogenannte Substantia compacta (auch Substantia corticalis genannt) der Außenschicht des Knochens entsprechend. Seine bedeckende äußerste Schicht -die „Knochenhaut“- wird als Periost, seine inneren Lagen als Endost bezeichnet. Auch wird der innere Bereich der HAVERSSchen Kanäle (s.u.) von Endost ausgekleidet. Das schwammartige Gewebe im Inneren des Knochens stellt die Substantia spongiosa dar. Es besitzt keine eigenen Blutgefäße und wird durch Diffusion über das Endost oder das zwischen den Bälkchen liegende Knochenmark ernährt (LÜLLMANN-RAUCH, 2012). Dieses Gerüst aus Trabekeln (im Durchschnitt beim Menschen etwa 0,3 mm x 0,6 mm dick bzw. lang) sorgt durch seine Architektur für eine ideale Verteilung des Druckes und der Zugkräfte durch die oben erwähnte Anordnung seiner Kollagenfibrillen. In der Knochenmatrix sind die Osteozyten in ihren Lakunen zu finden.

Geflechtknochen ist mit wenigen Ausnahmen nicht im ausgereiften Knochenskelett anzutreffen, diese stellen Knochenbruchheilungen (Kapitel 1.4.2. Frakturheilung), –neubildungen (desmale Ossifikation), Verbindungsnähte der Schädelknochen (= Suturen) und Knochenansatzpunkte von Sehnen und die Gehörknöchelchen im Innenohr dar. Geflechtknochen weist im Gegensatz zu Lamellenknochen keine lamellenartige Schichtung auf und ist ungeordnet in seiner Struktur (DRENCKHAHN et al. 2002; DIETZ und LITZKE, 2004; BARTL, 2011).

Das menschliche knöcherne Skelett setzt sich aus insgesamt 210 Knochen zusammen. Je nach Lage und Funktion sind diese in ihrer Morphologie äußerst vielgestaltig. Beispielsweise weisen die Extremitäten lange Röhrenknochen auf, deren Mittelteil -der Knochenschaft- als Diaphyse bezeichnet wird. Zu den Enden dieser stabartigen Knochen hin nimmt der Umfang des Knochenschaftes im Verlauf jeweils zu, seine gelenkbildenden Abschnitte, die sogenannten Epiphysen, sind mit Knorpel überzogen. Die Bereiche zwischen Epi- und Diaphysen, als Metaphysen bezeichnet, können im juvenilen Skelett noch eine Epiphysenfuge aufweisen. Diese besteht vorwiegend aus Knorpel und ist für das Längenwachstum des Knochens essentiell. Nach Abschluss der Wachstumsphase des Knochens bleibt als Rudiment die verknöcherte Epiphysenfuge als Linea epiphysialis bestehen (DRENCKHAHN, 2002; LÜLLMANN-RAUCH, 2012; JASTROW, 2015).

Knochenmikrostruktur

Wie der Name des Lamellenknochens bereits suggeriert, ist dessen Strukturelement die Knochenlamelle. Formbestimmend sind hier die in der Knochenlamelle verlaufenden Kollagenfibrillen der Kollagen-Typen I und V. Konzentrisch angeordnete Lamellen lassen sich begrifflich zu Osteonen subsummieren. In der Substantia corticalis nehmen sie 95 % des Volumens ein und werden aus durchschnittlich 30 konzentrischen Lamellen geformt (BENNINGHOFF et al. 2002). Zentral innerhalb dieser Lamellen bzw. innerhalb des Osteons liegt der Canalis centralis (= HAVERS Kanal). Dieser beinhaltet Blutgefäße und Nerven, die miteinander über die Canales perforantes (= VOLKMANNsche Kanäle) kommunizieren. Osteozyten stehen mit Hilfe Ihrer Zellausläufer miteinander über die Canaliculi ossei in Verbindung. Neben dem Kollagen-Typ I (90%) bestehen die restlichen 10% der organischen Matrix des Knochens (= Osteoid) aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen, (PAVELKA et al. 2005; NORBERT, 2011). Davon werden 20 % schließlich von Proteinen wie Fibronektin, Thrombospondin oder Osteopontin/ -calcin dominiert (BASLÉ et al. 1998; LÜLLMAN-RAUCH, 2012).

1.3.1. Zellen des humanen Knochens

Die Mehrheit der Knochenzellen (die Knochenbildner -Osteoblasten genannt- als auch deren in Überzahl vorkommenden Vorläuferzellen sowie die Osteozyten) leitet sich aus den mesenchymalen Vorläuferzellen (= Osteoprogenitorzellen) ab. Antagonisten der Osteoblasten sind die Osteoklasten, welche sich durch Induktion der Osteoblasten aus den Monozyten bzw. Makrophagen entwickeln (SCHIEBLER et al. 2007) und zum mononukleären Phagozytensystem gehören (WENISCH et al. 2003). Als wesentlicher

Produzent des organischen Matrixmaterials des Knochens (= Osteoid) gilt der Osteoblast. Charakteristisch für diese Zelle ist ein reichhaltiger Gehalt an alkalischer Phosphatase in seiner Plasmamembran. Der Osteoblast ist grundsätzlich in Bereichen anzutreffen, in denen es zu einer Knochenneubildung kommt. Weist er bloß eine geringe Aktivität der alkalischen Phosphatase auf, so bezeichnet man ihn in diesem Fall als osteozytären Osteoblast (LÜLLMANN-RAUCH, 2012). In verkalkter Knochenmatrix befindliche inaktive Osteoblasten werden als Osteozyten bezeichnet. Sie gelten als die Impulsgeber für den Auf- und Abbau des Knochens, indem sie netzartig über sogenannte Gap junctions (Nexus) miteinander verbunden sind. Gap junctions sind elektrisch geladene Kanäle, welche den Nährstoffhaushalt der in Osteoid eingebetteten Zellen über Sclerostin -ein sezerniertes Glykoprotein der Osteozyten- sichern. Weiterhin scheinen sie über Sclerostin auch das Remodelling zu regeln und zudem die osteozyten-spezifischen Proteine (Osteoprogenitorprotein, RANKL) und Gene für die Mineralisation zu beeinflussen (SAPIR-KOREN et al. 2014). Das Remodelling, welches den An-, Ab- und Umbau an die stetige Anpassung des Knochens als Antwort auf die extern einwirkende Belastung subsummiert, stellt einen lebenslangen Prozess dar und wird durch biochemische und biomechanische Einflüsse sowie osteotrope Hormone (Parathormon, Calcitriol und Calcitonin) beeinflusst (OFFERMANN, 2004). Die exakte Funktion der Osteoblasten-Vorläufer ist noch nicht abschließend geklärt, ist jedoch Gegenstand gegenwärtiger Forschung. Bereits bekannt ist allerdings, dass der Untergang dieser am längsten lebenden Knochenzellen mit dem Untergang der Knochenmatrix gleichzusetzen ist (SHENG et al. 2014), da diese Zellen eine Art Messinstrument für die knöcherne Beanspruchung sind. Kommt es zu einem Zelltod der Osteoblasten, führt dies unweigerlich zu einem Abbau des Knochens durch die Osteoklasten. So führt beispielsweise eine Erhöhung von IGF-1 (= Insulin-like Growth Factor - ein in der Leber gebildeter Wachstumsfaktor) zu einem vermehrten Knochenaufbau durch die osteoblastische Protease Phosphatase und unter Cortisol-Einfluss indirekt zu einer Hemmung der Knochenbildner (ABENDROTH et al. 1992; SCHMITT et al. 2007).

Die Funktion der Osteoklasten, die ähnlich wie Fremdkörperriesenzellen mehrere Kerne enthalten, besteht im Abbau der Knochenmatrix und ihrer Demineralisierung. Sie sind somit der Taktgeber für die Kalziumfreisetzung aus den Knochenspeichern. Findet man sie in ihrer aktiven Form vor, so lässt sich ultrastrukturell ein charakteristischer Faltensaum (= *ruffled border*) erkennen. In dieser zur Knochenmatrix gewandten Zellmembran liegt ein hoher Gehalt an Wasserstoffionen-Pumpen vor, welche über eine Kopplung an membranständige Ionenkanäle Chloridionen freisetzen können. Hieraus

resultiert ein Salzsäure-Gemisch, welches in der Lage ist, Knochensalze aufzulösen (SCHIEBLER et al. 2007).

Der Knochen ist somit dynamisch und unterliegt einem ständig ideal angepassten Zustand durch die oben genannten Zellen. Darüber hinaus ist er in der Lage, sich selbst zu regenerieren (CHING-CHANG et al. 2007). Dies wird vor allem dadurch ermöglicht, dass ein Teil der Osteoblasten (15%) in einer Art Ruhezustand epithelartig auf der Osteoidoberfläche liegt und als sogenannte „bone lining cells“ (Saumzellen) wieder reaktiviert werden kann (SCHERZED, 2009; RUEGER, 2010).

1.3.2. Osteocalcin und Osteopontin

Osteocalcin ist ein Vitamin-K-abhängiges Protein und ist vornehmlich im Knochen zu finden. In geringen Mengen kommt es auch in Dentin vor. Es wird ebenfalls von Osteoblasten sezerniert und dient als Aktivator der Knochenbildung (LEE et al. 2007) und ist ein Marker für den ausgereiften Osteoblast (HANDSCHEL, 2007). Des Weiteren dient es der Knochenmineralisation und der Regelung des Kalziumhaushaltes des Knochens. Es ist daher nachvollziehbar, dass dieses Protein als Marker für die Knochensynthese angesehen wird und erhöhte Serumwerte indirekt für eine erhöhte Knochendichte sprechen, da in diversen Studienreihen ein Einfluss auf den Metabolismus nachgewiesen wurde (KINDBLOM et al. 2009; LUMACHI et al. 2009; PITTAS et al. 2009).

Osteopontin (Bone sialoprotein I) ist, wie die alkalische Phosphatase auch, ein extrazelluläres Strukturprotein und zugleich ein organischer Knochenbestandteil. In erster Linie erfolgt eine Synthese durch Osteoblasten und Osteozyten (sog. bone-forming-cells). Aber auch in Osteoklasten, Makrophagen und Odontoblasten (REINHOLD et al. 1990) wurde eine Synthese nachgewiesen. Seine Synthese wird durch das in der Niere gebildete Calcitriol (1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol) angeregt. Die genaue Regulation von Osteopontin ist noch nicht vollständig geklärt. Im Knochengewebe dient es, wie sein Name andeutet (Pons: lateinisch für Brücke), der Bindung von Biomineralien wie Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat (ADDISON et al. 2010; AZZOPARDI et al. 2010) und inhibiert Proteine, die eine Mineralisation hemmen würden. Bei Individuen, bei welchen durch Genmutationen dieses Protein defekt ist, wurde eine Osteomalazie beobachtet, was die zuvor erwähnte Funktion dieses osteoblastischen Proteins erhärtet (BARROS et al. 2013).

1.4. Fraktur

Bei einer Fraktur entsteht zunächst lokal ein wulstartiges Kallusgewebe. Es wird hierbei zwischen einer primären und sekundären Frakturheilung differenziert. Die Einteilung basiert auf dem Abstand zwischen den beiden Frakturrenden. Ist der Abstand geringer als 1 mm und liegt ein intaktes Periost vor, so findet eine primäre Frakturheilung statt, bei welcher unmittelbar über Einwanderung von ruhenden Saumzellen des Periosts und Osteoprogenitorzellen innerhalb kürzester Zeit Lamellenknochen entsteht. Der Weg der sekundären Frakturheilung führt zunächst über die Zwischenstufen der Narbenbildung und des Geflecht-knochens. Zu Beginn bildet sich ein Hämatom aus und die abgestorbenen Knochenenden werden durch die Osteoklasten und Makrophagen abgebaut, bis diese auf vitales Gewebe und Zellen stoßen. Aus den eingewanderten Vorläuferzellen entwickeln sich dann wiederum die Knochenbildner. Anschließend wird über die enchondrale Ossifikation Geflecht- und schließlich -nach Wochen bis Monaten- Lamellenknochen gebildet.

1.4.1. Definition und Klassifikation nach AO

a) AO-Klassifikation(Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese)

Die Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen hat für die Klassifikation sämtlicher Frakturen ein System entwickelt, welches international eine Graduierung der Fraktur zulässt. Jede Knochenregion hat ihre eigene Ziffer von 1 bis 9. Mit aufsteigendem Schweregrad von A bis C nimmt diese zu und besteht aus einem alphanumerischen vierstelligen Code. So steht bei gelenknahen Frakturen A für eine extraartikuläre Fraktur, B für eine teilweise das Gelenk betreffende Fraktur und C für eine vollständige intraartikuläre Fraktur. Bei diaphysären Läsionen stellt A eine einfache, B eine Keil- und C eine komplexe Fraktur dar. Weiter wird dann der Knochen in drei Bereiche eingeteilt: 1 für die proximale Metaphyse, 2 für die Diaphyse und 3 für die distale Metaphyse. Zuletzt wird dann der Schweregrad wieder mit arabischen Ziffern von 1 bis 3 belegt. Beispielsweise wird eine einfache extraartikuläre Tibiakopffraktur mit 41A1 bezeichnet, 4 für die Tibia, 1 für den proximalen Anteil, A für extraartikulär und 1 für eine einfache Diskontinuität. Dieses System hat sich weltweit durchgesetzt und ist von eminenter Bedeutung bei der Therapieentscheidung. Neben dieser bewährten Einteilung hat sich ebenso eine Graduierung zwischen einer offenen und geschlossenen Fraktur (Tabelle 1 und 2) durchgesetzt.

b) Offene Fraktur

Die offenen Frakturen setzen einen Weichteilschaden voraus, bei dem Knochen nicht mehr durch den Weichteilmantel bedeckt wird. Nach GUSTILO und ANDERSON (1993) werden folgende Schweregrade (Tabelle 1) nach den unten aufgeführten Gesichtspunkten klassifiziert:

- Größe der Fraktur in Zentimetern
- Weichteilschaden
- Kontamination der Wunde
- Art der Fraktur

Tabelle 1: Klassifikation offene Frakturen

GUSTILO und ANDERSON (1993) - Klassifikation der offenen Frakturen (vereinfacht)

	Größe (cm)	Wundkontamination	Weichteilschaden	Art der Fraktur
I	< 1	Gering	Keine Quetschung	Einfach
II	1- 10	Mäßig	Geringe Quetschung	Trümmerzone
III	>10	Hoch	Ausgeprägt	Große Trümmerzone

c) Geschlossene Frakturen

Tabelle 2: Geschlossene Frakturen

Hier lassen sich vier Typen unterscheiden und werden nach TSCHERNE und OESTERN (1982) eingeteilt (vereinfacht)

0	Kein Weichteilschaden, einfache Fraktur
1	Schürfung, Quer- oder Schrägfraktur
2	Kontaminierte Schürfung, Mehrfragmentfraktur
3	Weichteilschaden mit Zerstörung von Muskulatur und drohendem Kompartmentsyndrom (Engpass eines Nerven), Trümmerfraktur

Eine offene Fraktur ist aufgrund eines verletzten Hautmantels und einer damit einhergehenden Infektionsgefahr weitaus komplizierter als eine geschlossene (Tabelle 2) Fraktur. Inwieweit das Weichteilgewebe betroffen ist, wird anschließend nach TSCHERNE und OESTERN (1982) dokumentiert und dementsprechend therapiert. Eine, z.B. bei einem Verkehrsunfall entstandene, offene Fraktur, sollte noch am Unfallort mit Verbandsmaterial bedeckt und erst wieder im OP-Saal unter sterilen Bedingungen geöffnet und versorgt werden.

1.4.2. Frakturheilung

Führen Kräfte zu einem Weichteil- und Knochendefekt, so wird die Perfusion des betroffenen Gewebes herabgesetzt und umdisponiert. In der Regel werden $\frac{2}{3}$ der langen Röhrenknochen von den Gefäßen des Markraumes und die restlichen $\frac{1}{3}$ des Kortex durch Perfusion mittels der periostalen Gefäße versorgt (CLAES, 2006). Ist die Fraktur nicht zu groß, liegt also kein *critical size defect* vor, kann es zur völligen Abheilung kommen. Hierzu sind jedoch eine schnelle Wiederherstellung der anatomischen Gegebenheiten sowie eine mechanisch stabile Fixierung der Fragmente vonnöten, sodass eine natürliche Re-Osteosynthese ablaufen kann (SPICER et al. 2012).

Diese kann über zwei Mechanismen ablaufen:

Über die **primäre** Frakturheilung kann es ohne Kallusbildung zur *restitutio ad integrum* kommen, also einer völligen Wiederherstellung des Gewebes ohne Narbenbildung, wenn der Frakturspalt nicht größer als 0,5 bis 1 mm (STÜRMER, 1984; KLAUSHOFER, 1994) ist sowie eine vollständige biomechanische Stabilität und kein Bewegungsspielraum zwischen den beiden Fraktarenden vorherrscht. Aus diesem Grund wird die primäre osteonale Regeneration auch Kontaktheilung (bis 100 µm) genannt, da noch eine Verbindung der Fraktarenden besteht und die nutritive Versorgung noch vorhanden ist. Von einer Spaltheilung spricht man hingegen bei Werten von über 500- 1000 µm (STÜRMER, 1996). Dass distal der Arteria nutritiva kleine Nekroseareale vorhanden sein können, diese jedoch für die Osteosynthese nicht von Relevanz sind, konnte durch STÜRMER (1996) nachgewiesen werden. Beide Formen der primären Frakturheilung führen also ohne Kallusbildung zu einer direkten Synthese von Lamellenknochen, indem die Osteoblasten aus den Osteonen über bestehende Gewebebrücken zu dem Frakturfragment migrieren können und hier Endost bilden.

Im Gegensatz dazu kommt es zu der **sekundären** Frakturheilung, wenn eine relative Stabilität und Mikrobewegung vorhanden sind (STÜRMER, 1996). Die nichtosteonal genannte Reosteosynthese (KUSTER et al. 2011) ist abhängig von der interfragmentären Dehnung. Definiert wird hier der Bezug zwischen der Deformation der Fraktur selbst und der Größe des Spaltes. Die Dehnung darf nicht > 2 % betragen um die Menge der Gewebebildung nicht negativ zu beeinflussen (JOHNSON et al. 2005). Ebenso besteht auch hier wieder ein dependentes Verhalten zum Abstand der Defekt-Enden, welcher nicht mehr als 1 mm betragen sollte (STÜRMER, 1984 und 1996). Auch bei der sekundären Resynthese wird zwischen einer Kontakt- und einer Spaltheilung

differenziert, nur dass hier Kallusgewebe gebildet wird und die Spaltbreite größer als bei der primären Heilung ist. Bei der sekundären Heilung wird stets die gleiche Kaskade durchlaufen, welche sich in 3 Phasen gliedert (BÜTTNER et al. 2003; GRIFKA et al. 2103):

Unmittelbar nach dem Ereignis beginnt die **Akutphase** (1. Phase), in der durch die rupturierten Blutgefäße PDGF, VEGF und TGF- β (transforming growth factor) freigesetzt werden und eine hochselektive Kaskade eingeleitet wird. Diese Wachstumsfaktoren locken Thrombozyten an und sorgen für die neue Aussprossung von Gefäßen (VEGF = Vascular endothelial Growth Factor). Zunächst kommt es somit zur blutstillenden Thrombenbildung mittels Fibrin und es werden durch Zytokine (Botenstoffe) der Thrombozyten (TGF- β , CXCL 4, IL-1) andere Zellarten der Akut-Phase-Reaktion wie die Makrophagen/ Monozyten über ihre Chemokin- Rezeptoren angelockt. Die Chemokine dieser Zellen wiederum lassen Osteoblasten und Osteoklasten aus mesenchymalen Stammzellen regenerieren und leiten die nächste Phase der Heilung ein. Dieser Vorgang nimmt bis zu mehreren Stunden in Anspruch.

Im fließenden Übergang wird der Thrombus durch Granulationsgewebe (2. Phase) ersetzt und die **Reparationsphase** eingeleitet. Diese dauert bis zu 6 Wochen. Durch die Neoangiogenese im Frakturspalt kommt es zur Einsprossung von Blutgefäßen in den frakturierten Knochen, welche eine Migration von Progenitorzellen und Wachstumshormonen wie BMP 2/7 ermöglicht. Diese Wachstumshormone wirken osteoinduktiv, indem sich Fibroblasten oder Knorpelzellen aus dem mesenchymalen Stammzellpool herausdifferenzieren. Somit ist der Grundstein für eine Kallusbildung gelegt, da nun diese Zellen vor allem Kollagen-Typ I (Fibroblast) und Kollagen-Typ X (Chondrozyt) produzieren. Dieses Bindegewebe wird von Chondrozyten besiedelt und führt über deren Hypertrophie zu ihrer Apoptose (= gerichteter Zelltod). Dies lässt den Knorpel über Wachstumsfaktoren zu Geflechtknochen kalzifizieren.

Mit dem **Remodelling** des Knochens und damit der letzten (3.) Phase, kommt es wiederum unter dem Einfluss von Scher- und Zugkräften zu einer Ausbildung eines Lamellenknochens, wofür individuell mehrere Jahre benötigt werden können. Als Reiz wirkt die mechanische Belastung um die Trajektionsstruktur wiederherzustellen. Wirken nun auf den Bindegewebskallus Scherkräfte, so wird zuerst hyaliner Knorpel gebildet welcher anschließend über die enchondrale Ossifikation verknöchert wird (BÜTTNER et al. 2003). Unterbleibt die Fusion der Bruchenden und es kommt zu keiner Ruhigstellung innerhalb des Knochens, läuft der Patient Gefahr, eine Pseudarthrose (1.7.2.) zu entwickeln.

1.5. Das ideale Knochenersatzmaterial

Das ideale Knochenersatzmaterial sollte nach MUTSCHLER und LANE (1993) eine hohe biologische Wertigkeit besitzen. Unter biologischer Wertigkeit wird die osteogene und osteoinduktive Aktivität, die Osteokonduktion, Vaskularisation und zuletzt die biomechanische Stabilität verstanden. Auch heute gelten diese Kriterien, jedoch können sie um Biokompatibilität und Ökonomie erweitert werden. Wählt der Operateur nun ein Implantat, sei es aus Mangel an eigener Knochensubstanz oder fehlender Spendenbereitschaft, so sollte es eine hohe biologische Wertigkeit besitzen bzw. möglichst viele der aufgeführten Kriterien erfüllen. Diese sind ein Maß dafür, ob der Knochenersatz in körpereigenen Knochen umgesetzt werden kann.

1.6. Biologische Wertigkeit

1. *Osteokonduktion*: Das Material vollzieht eine Art Mimikry der Knochenarchitektur (was in diesem Fall als „Scaffold“ bezeichnet wird), fungiert somit als Leitschiene für die Zellinvasion und –adhäsion (SCHIEKER et al. 2008; RENTSCH et al. 2012) und umfasst den Prozess der Infiltration von Kapillaren, perivaskulären Stoffen und Osteoprogenitorzellen aus dem Empfängerknochen in das substituierte Material (SUTHERLAND et al. 2005). Die Vaskularisation ist für die Trophik der Knochenzellen und für die Knochenneubildung unerlässlich. Hierfür sollte das Biomaterial allerdings eine interkonnektierende Porosität aufweisen (HEINEMANN et al. 2011).
2. *Osteoinduktion und -integration*: Die anliegenden oder applizierten Osteoblasten werden angeregt, Osteoid zu produzieren und fördern so das Einwachsen des Implantats in die Knochenmatrix (SCHWENZER et al. 2000).
3. *Osteogenität*: Unter osteogen aktivem Material wird Zellmaterial verstanden, welches die Fähigkeit besitzt, zu Knochenzellen zu differenzieren und Knochensubstanz zu produzieren, sodass bei Defektstellen das Implantat damit funktionalisiert werden kann. Dadurch wird der Prozess der Frakturheilung beschleunigt.
4. *Biomechanik*: Eine Herausforderung an die biologischen Knochenersatzmaterialien stellt die Biomechanik dar. Freilich möchte der Operateur Defekte idealerweise so versorgen, dass eine gewisse Primärstabilität und eine sofortige Mobilisationsfähigkeit gegeben sind. Doch gilt es hier, ein Material mit einem höheren Elastizitätsmodul als dem des Knochens zu

vermeiden, da es sonst nicht zu einer Knochenproliferation kommt, sondern gar zum Knochenschwund (HEINEMANN et al. 2011).

5. **Biokompatibilität:** Das Material darf keine zellschädigenden Stoffe enthalten und sollte idealerweise komplett in Knochen umgewandelt werden können (Degradationsfähigkeit). Zudem darf es durch kommerzielle Sterilisationsverfahren nicht in seinen Eigenschaften eingeschränkt werden (SCHIEKER et al. 2008).
6. **Ökonomie:** Aufgrund immer weiter steigender Kosten im Gesundheitssystem würde ein überteuertes Material an Lukrativität verlieren, wenn es teurer wäre als anderer biologischer Knochenersatz.

Das ideale Knochenersatzmaterial sollte stets zur Verfügung stehen, eine sofortige Primärstabilität und ein niedriges Infektionsrisiko bieten sowie alle sechs oben genannten Kriterien erfüllen. Bis dato gibt es noch kein Implantat, welches diese Auflagen vollends erfüllt.

1.7. Arten und Einsatzgebiete der verschiedenen Knochenersatzmaterialien

Die Knochenersatzmaterialien kommen vorwiegend bei einem sogenannten *Critical-Size-Defect* (CSD) zum Zuge. Hierunter versteht der Chirurg, dass Defekte ab einer gewissen Größe nicht das Selbstvermögen haben, während eines Menschen- (bzw. Tier-) Lebens zu heilen und dadurch eine Intervention vonnöten ist (SPICER et al. 2012). Unter den Knochenersatzmaterialien (Tabelle 3) werden der autologe, allogene, xenogene (OLLIER, 1856) und alloplastische Knochenersatz subsumiert (Kapitel 1.6.1. und 1.6.2.). Eine weitere Einteilung lässt sich Tabelle 4 entnehmen. Hierbei fasst man die ersten drei zum natürlichen Knochenersatz zusammen, der alloplastische wird auch artifizieller Knochenersatz genannt.

Tabelle 3: Klassifikation Knochenersatzmaterialien nach Rueger (1992):

Gruppe	Kennzeichen
1	synthetische, anorganische Knochenersatzmaterialien
2	synthetische, organische Knochenersatzmaterialien
3	biologische, organische Knochenersatzmaterialien
4	Composites (Materialkombinationen aus den Gruppen 1–3)

1.7.1. Natürliche Knochenersatzmaterialien

Hierunter werden Materialien verstanden, die selbst nach chemischer Behandlung weitestgehend dem Ausgangsprodukt ähneln. Hierbei kann zwischen reinen spongiösen oder kortiko-spongiösen Transplantaten gewählt werden. Jährlich werden weltweit ca. 800 Mio. US-Dollar für biologische Knochenmaterialien ausgegeben, Tendenz steigend (Der EUROPAMARKT FÜR BIOMATERIALIEN, 2003). Die Indikationsstellung ist unter anderem bei Überbrückung von Trümmerzonen bei schweren Knochentraumen, bei größeren iatrogen-bedingten Knochendefekten, nach der Resektion von Tumoren, bei Pseudarthrosen oder osteomyelitischen Herden, Umstellungsosteotomien sowie bei Arthro- und Spondylodesen gegeben (TRENTZ, 1986). Daneben beschreiben TSCHERNE und REGEL (1996) eine Indikation bei Mehrfragment- und Trümmerbrüchen, Kompressions- und Berstungsbrüchen im spongiösen Bereich, Pseudarthrosen und infektbedingten Knochensubstanzverlusten und in der Endoprothesenchirurgie.

1.7.1.1. Autologe Knochenersatzmaterialien:

Muss nun ein defekter Knochen substituiert werden, so steht dem Kliniker neben den Implantaten vorrangig die autologe Substitution durch Kompakta oder Spongiosa zur Verfügung. Da die Spongiosa sehr porös ist, wird sie im Vergleich zur Kompakta zehnmal schneller vaskularisiert, was ein schnelleres Einwachsen ermöglicht (SAILER, 2000). Dies ist vor allem nach Strahlentherapien relevant und gilt hier als Goldstandard (SCHNETTLER et al. 1997; CHING-CHANG et al. 2007; ROSHAN, 2011), da sich in diesem unbehandelten Gewebe noch Wachstumsfaktoren wie das BMP-II und Stammzellen mesenchymalen Ursprungs befinden, welche eine schnelle Integration des Ersatzmaterials in den Defektbereich ermöglichen. Nachteilig ist ein möglicher vermehrter Blutverlust oder Hämatome, Infektionen, Frakturen, neurovaskuläre Schäden, kosmetisch störende Narben an der Entnahmestelle und eine verlängerte Operationszeit (CAMPANA et al. 2014). Doch selbst wenn man zuvor genannte Komplikationen außer Acht lässt, ist das größte Problem die begrenzte Verfügbarkeit, vor allem bei Kindern und Patienten höheren Alters (CAMPANA et al. 2014). In der Klinik zeigt sich, dass es sich bei 50 % der Frauen und 15 % der Männer mit Erstfrakturen um eine osteoporotische Fraktur handelt (BARTEL, 2011). Die Osteoporose ist *per definitionem* eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert wird, in deren Folge es zu vermehrter Knochenbrüchigkeit kommt (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS, 2001). So ist es mitunter

in diesem Patientenkollektiv häufig schwierig, eine befriedigende Menge an Spongiosa aus dem Beckenkamm, Radius oder dem Tibiaplateau zu entnehmen, auch weil die Spongiosa-Entnahme einen Zweiteingriff implementiert und wiederum mit Risiken, wie Schädigung von strukturellen Nerven, Blutungen und Infektionen behaftet ist.

1.7.2. Allogene Knochenersatzmaterialien

Unter allogenem Knochenersatz wird eine Defektfüllung mittels Knochen, der der eigenen Spezies entstammt, verstanden. Hier kann zwischen kortikalem oder spongiösem Knochen direkt von einem zum anderem Individuum, in gefrorener oder in lyophilisierter Form, transplantiert werden (HEINEMANN et al. 2011). Die Fremdspende macht unter allen Knochenersatzmaterialien ca. 34 % aus (ROSHAN et al. 2011). Sie ist zwar osteokonduktiv, jedoch ist ihr Vorkommen limitiert und in der Regel ist sie nicht osteoinduktiv oder osteogenetisch und mit einer -wenn auch minimalen- Infektionsrate assoziiert (Laurencin et al. 2006). Nicht zu vernachlässigen ist auch die Möglichkeit einer Transplantation von Tumorzellen (SCHNETTLER, 2004).

1.7.2.1. Xenogene Substitution

Unter diesem Knochenersatz versteht man den heterologen bzw. den tierischen Gewebeeinsatz, bei dem zumeist boviner, selten auch porciner Knochen verwendet wird. Die erste dokumentierte Transplantation tierischen Knochens als Ersatz in einem menschlichen Defekt wurde von MEEKREN 1632 durchgeführt, als er versuchte einen Schussdefekt im Schädel mittels Hundeknochen zu versorgen (RUEGER et al. 2010).

Erstmals zur Anwendung kam der sogenannte „KIELER SPAN“ (heterologer Knochenersatz tierischen Ursprungs) Ende der 60iger Jahre und zeigte, dass er ähnliche Eigenschaften wie allogener Knochen aufwies (BAUERMEISTER, 1961). Auch hier kann es, ähnlich dem allogenem Ersatz, zu einer Übertragung von pathogenen Keimen oder dem Auslösen einer Immunreaktion führen. Weiter verhält es sich bei der xenogenen Substitution so, dass durch die Aufbereitung und chemische Behandlung ein Vieles an biologischer Wertigkeit und somit entsprechend auch die mechanischen Eigenschaften verloren gehen.

1.7.2.2. Wachstumsfaktoren

Den Bone Morphogenetic Proteins, kurz BMPs, wird vor allem eine osteoinduktive Aktivität zugesagt und sie kommen im klinischen Alltag vielfach zum Einsatz. Im Gegensatz zu Mitogenen (lokal wirksame Wachstumsfaktoren), welche für Ihre Wirkung Osteoprogenitorzellen benötigen, sind BMPs in der Lage, selbst in nicht- knöchernen Geweben die ortsansässigen Zellen zu einer Ossifikation anzuregen (TESCHNER et al. 1999). Hierbei sind vor allem zwei Wachstumsfaktoren wichtig, die rekombinanten Wachstumsfaktoren BMP-2 (NN Eptoterminal Alpha, Handelsname Osigraft®) und BMP-7 (OP-1, INN Eptoterminal A, genra®). BMP-2 besitzt neben seiner osteokonduktiven Wirkung ebenso die Fähigkeit die Chemotaxis, Differenzierung und Proliferation von Stammzellen anzuregen (RIBEIRO et al. 2015; POON et al. 2016). Bei der Therapie von variablen knöchernen Problemen wie der offenen oder geschlossenen Fraktur, dem Knochendefekt, dem Infekt und der verzögerten Heilung sowie der Pseudarthrose, wurden die Wachstumsfaktoren angewandt und untersucht (FRIEDLANDER et al. 2001; GOVENDER et al. 2002; JONES et al. 2006; MCKAY et al. 2007; AXELRAD et al. 2009).

Seit ihrer Entdeckung 1988 (BODEN et al. 2005) wurden bis heute mindestens 20 BMP *in vitro* getestet und zeigten ihre potente Wirkung in der Differenzierung von Stammzellen in Osteoblasten neben etlichen Tiermodellen auch im humanen Modell (GAUTSCHI et al. 2007) und zählen aufgrund dessen zu den transforming growth factors (TGFs) (CICCIU et al. 2014). Jedoch wurden von der FDA bis dato die Matrixproteine nur für Unterschenkelgelenkpseudarthrosen, Wirbelsäulenfusionsoperationen und 1.- bis 2.-gradig offene, akute Unterschenkelfrakturen zugelassen. Dies liegt darin begründet, dass diese Proteine bei anderen Indikationen meist nicht den evidenzbasierten Effekt erzielen (RUEGER et al. 2010), sich in der Applikation als schwierig erweisen und mit hohen Kosten verbunden sind (ORYAN et al. 2014). Daher finden diese meist im Off-Label-Use Anwendung. Bei korrekter Anwendung sollen diese jedoch die Knochenheilung beschleunigen (POON et al. 2016).

Italienische Wissenschaftler konnten 2010 Erfolge am Holz publizieren und auch industriell veränderte Korallen zeigten erste erfolgreiche Ergebnisse indem man diese mit BMP versah (CAMPANA, 2014). Rekombinantes BMP-2 findet vor allem in der Dentalchirurgie Einzug und zeigte nach mandibulären Knochentumoren einen hohen Knochenumsatz innerhalb des Defektes und damit eine beschleunigte Knochenheilung (ZÉTOLA et al. 2010; CICCIU et al. 2014).

1.7.3. Artificielle Knochenersatzmaterialien

Immer mehr tritt die Substitution mittels artifiziellen Knochenersatzes in der Klinik in Erscheinung. Nicht zuletzt, weil natürliche Knochenersatzmaterialien eine begrenzte Verfügbarkeit haben (HEINEMANN et al. 2011), einen schmerzhaften Zweiteingriff bedingen und der allogene Ersatz mit einem Infektionsrisiko einhergeht. Es ist für die gegenwärtige Forschung von großem Interesse, sich eines Knochenersatzstoffes zu bedienen, welcher unbegrenzt zur Verfügung steht, kostengünstig ist und die Frakturheilung anregt. Der Begriff „artifizial“ soll Stoffe bezeichnen, die auf künstlich hergestelltem Ausgangsmaterial oder biologischen Materialien basieren, welche aber durch Verarbeitung divergent vom Ursprungsmaterial sind. Synonym wird der Begriff „alloplastisches Knochenersatzmaterial“ gebraucht (GUTWALD et al. 2010).

Nach SMEETS et al (2010 und 2014) wird beim alloplastischen Ersatz zwischen folgend aufgeführten differenziert:

- Keramiken: z. B. Biogläser, Trikalziumphosphatkeramik (TCP), Hydroxylapatit, Glas-Ionomere
- Metalle: z. B. Stahl und Titan
- Polymere: Polymethylmethacrylat, Polylaktide/ Polyglykole und Co-Polymere
- Zemente: z. B. Kalziumphosphat-Zemente

Weiter kann man diese nun in synthetisch-organisch und synthetisch-nichtorganisch einteilen (RUEGER, 2010). Zu den synthetisch-organischen Knochenersatzmitteln zählen die Kalziumphosphate und die bioaktiven Gläser und Glaskeramiken.

Synthetisch-organische Knochenersatzmittel:

1.7.3.1. Kalziumphosphatkeramik

Wichtigster Vertreter aus der Gruppe der Kalziumphosphate ist Hydroxylapatit (HA) mit der chemischen Strukturformel $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ (PAPE et al. 1986), welcher fast die Hälfte der natürlichen Knochensubstanz darstellt (LÜLLMANN-RAUCH, 2012). Kalziumphosphatkeramiken setzen sich vor allem aus Hydroxylapatit zusammen und besitzen eine ähnliche Struktur sowie chemische Eigenschaften wie der humane Knochen (WENISCH et al. 2003). In trockenem Zustand sind sie nur schwierig lokal applizierbar, da sie in Pulverform vorliegen. Im flüssigen Zustand jedoch nehmen sie eine stabile Form (HEISEL, 1987) an und können so z.B. auf Implantate aufgetragen werden oder andere Scaffolds beschichten, um so eine bessere Osteointegration zu schaffen. Damit die Kalziumphosphatkeramik (KPK) aushärten kann, also exergon ist,

wird eine dauerhafte Wärmezufuhr von mindestens 37 °C (endotherme Reaktion) benötigt (WENISCH et al. 2003).

Sie hat eine ähnliche Porosität wie der humane Knochen von 100 bis 1500 µm (MÜLLER-MAI, 2003), stellt somit die ideale Voraussetzung dar, um eine Zellinvasion und –adhäsion zu ermöglichen. Demzufolge die aus HA bestehende KPK osteokonduktiv und –integrativ. Porosität beschreibt die Beziehung zwischen dem Volumen des Hohlraumes und der Summe aller Volumina und sie sollte, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, das gleiche Verhältnis wie der Knochen aufweisen. Weiter konnten SCHNETTLER et al. (2004) zeigen, dass durch diese Porosität eine, wenn auch gering signifikante, Degeneration und Resorption des Hydroxylapatits möglich ist. Aufgrund der unterschiedlichen Möglichkeiten, wird das Hydroxylapatit in der Chirurgie unter dem (Produktnamen) Endobon®, Cerabone®, Ceros 80® und Trikalziumphosphat [-TCP]: Ceros 82®), CaP Zemente (Biobon® [α-BSM], Calcibon®) sowie Nanoparticulate HA Paste (Ostim®), eingesetzt.

Trotz geringer osteogener und osteoinduktiver Aktivität (WENISCH et al. 2003; SCHNETTLER et al. 2004; SMEETS et al. 2014) fanden diese aufgrund der zuvor genannten Vorteile eine breite Anwendung in klinischen Studien (HEISEL, 1987; HARDOUIN et al. 1992; SPIVAK et al. 2001; MUSCHIK et al. 2001; WENISCH et al. 2003; BLATTERT et al. 2003; SCHNETTLER et al. 2004; NIHOUE et al. 2008; KARACAYLI et al. 2009). Aufgrund deren begrenzten Osteogenität sollten sie vorwiegend in stabilen Transplantatbereichen zum Einsatz kommen (SIEBERT et al. 1998). Die Produktion dieses Biomaterials läuft über zwei Schritte und benutzt als Ausgangsprodukt Rinderspongiosa. Zunächst erfolgt eine thermo-chemische Lyse der Bindungen zwischen den Molekülen durch eine Hitzezufuhr von über 700 °C. Hierfür wird kein Sauerstoff wie z.B. bei Verbrennungen benötigt. Die ursprüngliche Struktur des Ausgangskörpers bleibt erhalten, da lediglich kleinste Teilchen aggregieren und Hohlräume ausfüllen. Die Pulverform des HA verdichtet sich hierdurch. Diese hohen Temperaturen führen aber nicht nur zu der gewünschten Formgebung und Materialeigenschaft, sondern es werden nebenbei Proteine zerstört, was mit der Elimination von pathogenen Keimen wie Prionen (z.B. dem BSE-Erreger) oder krankmachenden Bakterien und Viren gleichgesetzt werden kann (KLAUS et al. 2006). Das Endprodukt auf HA-Basis wird unter dem Handelsnamen Endobone vertrieben. Weitere Vertreter dieser Kalziumphosphate sind Cerabone 80, Ceros 82, chornOS, Vitoss, SRS, Tutobone, Biobon, Calcibon und Ostim. Bis auf die ersten drei genannten sind alle Materialien resorbierbar (SCHNETTLER et al. 2004; KLAUS et al. 2006).

1.7.3.2. Bioaktive Gläser und Glaskeramiken

Entwickelt wurde dieses Biomaterial durch HENCH im Jahre 1969. Es basiert auf sauren oder basischen Oxiden (SMEETS et al. 2014) und ist aufgrund derer hohen Biodegradation (HEIMKE et al. 1978) vor allem als Oberflächenbeschichtung für Implantate relevant. Bei richtiger Anwendung sind sie zwar ebenso osteokonduktiv (RUEGER et al. 2010), aufgrund ihrer geringen Belastbarkeit stellen sie jedoch keinen Gegenentwurf zu den zuvor genannten stabileren allopathen Knochenersatzmaterialien dar. Glaskeramiken weisen ähnliche chemische Eigenschaften wie bioaktive Gläser auf und sind vor allem von Nutzen, wenn eine osteogene Aktivität und damit eine starke Verbindung zwischen Implantat und Knochengewebe gewünscht ist (BLENCKE et al. 1975), bei der der ossäre Schaden ersetzt werden muss, ohne gleichzeitig zu stabilisieren (BERENS et al. 2000). Ihre Herstellung läuft über die Biogläser durch erneute Hitzeapplikation und sie weisen eine verbesserte Bioaktivität als die Gläser auf (RENTSCH et al. 2012).

1.7.3.3. Metalle

Titan wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, da es einen ähnlichen Elastizitätsmodul wie der humane Knochen besitzt. Obwohl Titan als korrosionsbeständig gilt, kann es zu Implantatlockerungen kommen (WILLERT et al. 1996). Diese treten vor allem in Erscheinung, wenn Titan mit Zement gemeinsam angewandt wird, da Titan normalerweise mit Sauerstoff zu Titan-Oxid reagiert (Passivierungsschicht) (LICHTINGER et al. 2000) und ohne Sauerstoff eine korrosionsfreie Barriere nicht geschaffen werden kann. Auch fiel die Wahl auf Titan, da bekannt ist, dass Gewebe, welches an Reintitan angrenzt, eine suffiziente Durchblutung und - im Vergleich zu anderen Materialien - eine geringere Neigung zu Abstoßungsreaktionen aufweist (RUDY et al. 2002). Ein weiterer klinischer Vorteil sind kaum beschriebene allergischen Reaktionen (SCHUH et al. 2005; GOUTAM et al. 2014), sodass die Metallentfernung optional bleibt. SCHUH et al. (2005) zeigten, dass lediglich Reaktionen bei Nickelverunreinigungen im Titan, aber nicht bei Titan und seinen Legierungen selbst auftraten. So könnten durch Nickel oder Chrom sogenannte Sensibilisierungsreaktionen im Menschen hervorgerufen werden, welche eine allergische Reaktion auslösen (HALLAB et al. 2001; GOUTAM et al. 2014). Daneben weist es eine gute Biokompatibilität und eine hohe Korrosionsresistenz auf (TEXHAMMAR et al. 1994; ROSALBINO et al. 2012). Legierungen wie Ti6Al7Nb weisen

ebenso die zuvor genannten Vorteile des Reintitans auf, wobei zudem noch eine höhere Materialfestigkeit durch die Legierung erreicht werden kann (TEXHAMMAR et al. 1994). Die Titanlegierung der offenporigen Implantate (Abbildung 1) sollte, ähnlich wie andere Titanimplantate, durch seine hohe Biokompatibilität zu einer schnelleren Adaptation an der Implantat-Knochen-Grenze (RUDY et al. 2002; HAGEMANN, 2012) führen. Der Kalzium-Haushalt ist unmittelbar an den des Phosphates gekoppelt und befindet sich stets mit diesem im Gleichgewicht. Für die Kalzium-Homöostase verantwortlich sind das Hormon (das sog. Parathormon) der Nebenschilddrüse (Parathyroidea) und das in den C-Zellen des medullären Anteils der Schilddrüse (Thyroidea) gebildete Calcitonin. Der Knochen ist mit 98% der Hauptspeicher von Kalzium. Lediglich etwa 9% sind im Plasma zu finden (FROESCH, 1976). JUNG et al. (2010) zeigten, dass losgelöstes Kalzium eine Aktivierung der knochenassoziierten Proteine OPN (Osteoprogenitorprotein) und BSP (bone-specific Protein) durch die L-Typ-Kalzium- Kanäle und kalzium-abhängige Proteinkinase (CAMK2) auslöst, was zu einer Differenzierung der Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten führt. Darüber hinaus erhöhen Hydroxylapatit und Kalzium die Expression von alkalischer Phosphatase (QU et al. 2001). Die alkalische Phosphatase ist ein zelleigenes Enzym der Osteoblasten und ein indirekter Indikator für deren Aktivität und Differenzierung (LÜLLMANN-RAUCH, 2012). Um den Einfluss von Kalzium auf die Osteoblasten- Aktivität und die Osteointegration des Implantates zu eruieren, wählten wir eine Funktionalisierung durch Kalzium-Titanat. Rostfreier Stahl konnte sich nicht etablieren, da es rigider als Knochen ist und dadurch die Gefahr einer Sinterung der Fraktur bestünde. Dies liegt in seinem niedrigen Elastizitätsmodul begründet (GAHR, 2008).

1.7.3.4. Polymere

Vor allem die biologischen Polymere, z.B. das Kollagen, werden bevorzugt als Schwämme und in Verbindung mit weiteren osteoinduktiven Materialien (Wachstumsfaktoren) versehen oder aber zur Sanierung (Antibiotika) bei Infektarthrosen eingesetzt. Um eine bessere Geschmeidigkeit zu erzielen, werden die Polymere bevorzugt mit Kompositen wie Trikalziumphosphat oder Hydroxylapatit versehen (SCHNEIDERS et al. 2009, RENTSCH et al. 2012, SMEETS et al. 2014). Die synthetischen Polymere erzeugen beim Aushärten Wärme und können so in der Umgebung Hitzenekrosen verursachen. Vorteil ist jedoch, dass sie der gewünschten Form angepasst werden können (z.B. Palacos®, Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Deutschland) (SCHÜRER et al. 2003). Da sie nicht degradieren, ist ein Remodelling des Knochens nicht möglich (RENTSCH et al. 2012).

1.7.3.5. Zemente

Diese lassen sich bezugnehmend auf ihre Zusammensetzung in Ein- und Zwei-Komponenten-Systeme gliedern. Die Ein-Komponenten-Systeme sind kristallisierte Kalziumphosphate, wohingegen die Zwei-Komponenten-Systeme über eine Säure-Basen-Reaktion (saures und basisches Kalziumphosphat) zu einem neutralen Gebilde geformt werden (z. B. Cementek®, Teknimed, Vic-en-Bigorre, Frankreich) (RUEGER et al. 2010; RENTSCH et al. 2012). Klinisch kommen in Deutschland beispielsweise folgende Ein-Komponenten-Systeme zum Einsatz: Biobon®, BoneSource®, Calcibon®, Norian SRS® und ChronOss Inj® (RENTSCH et al. 2012). Zemente gelten als osteokonduktiv und biokompatibel. Aufgrund ihrer geringen mechanischen Belastbarkeit benötigt man bei dem Knochenersatz auch immer zusätzlich eine Osteosynthese.

Tabelle 4: Einteilung Knochenersatzmaterialien nach HEISS et al. 2008

	Herkunft	Wirkung	Verfügbarkeit	Nachteil
Autolog	Eigenspende	Osteokonduktiv, -induktiv, -gen,	Begrenzt	Im systemisch erkrankten Knochen nur begrenzt vorhanden
Xenogen	Tierischer Ursprung, Meeresalgen, Korallen	Osteokonduktiv	Freie Verfügbarkeit	Infektionen, biologische Wertigkeit geht durch Sterilisationsverfahren verloren
Allogen	Humane Fremdspende	Ostokonduktiv und -induktiv	Begrenzt	Abhängig von den Spenderzahlen, Infektionen
Artifiziell	Keramik, Titan, etc.	Osteokonduktiv	Freie Verfügbarkeit	Teuer und schlechte Osteointegration
Wachstumsfaktoren		Osteogen, -konduktiv und induktiv	Freie Verfügbarkeit	Sehr teuer und Karzinomrisiko

1.7.4. Alloplastische Knochenersatzmaterialien

Wird aus xenogenem Ausgangsmaterial durch chemische oder physikalische Prozesse ein Knochenersatzmaterial (IMC, 2016) gewonnen, wird von einer alloplastischen Substitution gesprochen. Hierzu zählen in Tabelle 4 die allogenen und xenogenen Knochenersatzmaterialien, sowie die Wachstumsfaktoren.

Nachteilig ist wie bei allen Knochenersatzmaterialien tierischen Ursprungs, dass Krankheitserreger übertragen werden können und durch das Aufbereiten biologische Wertigkeit verloren geht. Nach den Kriterien des International Medical College (IMC) (2016), sollten alloplastische Substitutionen folgende Kriterien erfüllen, damit eine suffiziente Osteointegration ablaufen kann:

1. *Drug delivery system*: Das Surrogat oder der sogenannte modifizierte *Carrier* (= Trägermaterial) soll durch Funktionalisierung Osteogenese anregen
2. Die Funktionalisierung sollte in das biologische Material nach Bedarf und kontrolliert abgegeben werden
3. Das Material sollte osteointegriert werden
4. Die biologische Wertigkeit muss gegeben sein

1.8. Einsatzgebiete für Knochenersatzmaterialien

Nach TRENTZ et al. (1986) ergeben sich folgende Einsatzgebiete für Knochenersatzmaterialien (modifiziert):

- Frakturen
- größere Knochendefekte nach der
- Resektion von benignen und malignen Knochentumoren
- Pseudarthrosen
- osteomyelitische Herde
- Osteotomie
- Arthro- und Spondylodesen

Therapieziel der Substitution ist es, den natürlich Regenerationsprozess des Knochens zu unterstützen und die knöchernen Defektareale zu stabilisieren. Im Idealfall führt es narbenlos zu einer Abheilung mit Herstellung der vor der Fraktur befindlichen physiologischen und mechanischen Eigenschaften (RUEGER et al. 2010). Idealerweise

ersetzt somit das Knochenersatzmaterial die Funktion des Knochens und fördert die Genesung.

1.8.1. Benigne und maligne Knochentumore

Da die gutartigen Knochengeschwüre 99 % aller Tumore des Knochens ausmachen, sollte dem Kliniker die Vielfalt dieser Tumoren bekannt sein, da damit auch der Grundstein für die Therapie gelegt werden kann. Hierzu zählt man folgende Tumore: Osteome, Enostome, Osteoidosteome und Osteoblastome (HEUCK et al. 2001). Die häufigsten aller Knochentumore sind Osteochondrome (48%), Enchondrome (23%), Osteoidosteome (10%) und Chondroblastome (5,5%) (HARDES et al. 2001). Nahezu alle gutartigen Knochentumore befinden sich an der Oberfläche und können ertastet werden. Klinisch treten diese kaum in Erscheinung, sondern fallen bei Traumata in der bildgebenden Diagnostik in der Regel als Zufallsbefund auf. In der Therapie unterscheiden sich maligne und benigne Tumore dahingehend, dass bei den bösartigen Formen eine R0-Resektion (histopathologisch ist kein Nachweis mehr von Tumorzellen im Präparationsgebiet möglich) stets angestrebt wird, wohingegen bei der intraläsionalen Kürettage von gutartigen Tumoren keine R0-Resektion erreicht wird bzw. werden muss. Diese Kürettage erfolgt mithilfe von scharfen Löffeln und Fräsen, welche die betroffenen Knochenareale entfernen. Falls nötig, kann durch die Jet-Lavage Resttumor entfernt werden. Das entfernte Material sollte anschließend histopathologisch untersucht werden, um einen malignen Tumor nicht zu verkennen. Anschließend wird der gesetzte Defektbereich mit Knochenersatzmaterial ausgefüllt. Meist erfolgt die Substitution mittels Knochenzement durch die Zementpistole (STEIN et al. 2015).

Das Plasmozytom ist eines der häufigsten malignen Knochentumore (Inzidenz 4: 100.000) und zählt zu den Lymphozytenproliferierenden Karzinomen, bei denen ein B-Zell-Klon das Knochenmark infiltriert, Osteoklasten durch OAF (Osteoklasten aktivierender Faktor = RANKL) aktiviert und dadurch Knochen systematisch destruiert wird. In 66 % der Fälle konnte eine Panzytopenie nachgewiesen werden (BERTRAM, 2006). Kommt es zu multilokulären Foki im Knochen, dann wird dies als Multiples Myelom bezeichnet. Symptomatisch stehen vor allem Schmerzen und Frakturen im Vordergrund, welche neurologische Defizite bis hin zum Querschnittssyndrom verursachen können. Der modifizierte Statistik der Lokalisation von osteolytischen Herden des Plasmozytoms nach DEICHER (1997) lässt sich entnehmen, dass die Brust- und Lendenwirbel mit am häufigsten betroffen sind. Die logische Konsequenz daraus ist,

dass solche Osteolysen richtig versorgt sein wollen, um Komplikationen, wie oben genannt, zu vermeiden.

Tabelle 5: Osteolysen Plasmozytom nach DEICHER (1997):

Schädel	83
Hals- und Brustwirbel	56
Lendenwirbel	51
Rippen	41
Becken	38
Femur	35
Klavikula	23

1.8.2. Osteomyelitische Herde

Implantate können auch nach einer abgeheilten Osteomyelitis mit knöchernen Defekten zum Einsatz kommen. Diese Erkrankung beschreibt eine Entzündung des Knochenmarkes durch virulente Erreger, die aufgrund der Reaktion auf die Entzündung mit einer Gewebeerstörung einhergeht. Infektiöse Agenzien können während einer Bakteriämie über das Blutsystem aus einem purulenten (ROVENSÝ et al. 2009) "Hot-Spot" oder aber durch offene Frakturen und Operationen direkt in das Knochengewebe gelangen. Dabei kann zwischen einer akuten und chronischen Form differenziert werden. Nach TAUCHNITZ et al. (2005) sind bei der akuten Osteomyelitis vor allem die langen Röhrenknochen (Humerus, Femur, Tibia) betroffen, wohingegen man bei der chronischen Form Fisteln (Verbindungen zwischen Gewebeteilen, meist durch Entzündungen hervorgerufen) antrifft. Dies zeigt, dass die akute anders als die chronische Form therapiert werden muss und es bei einer chronischen Osteomyelitis zu einem langen Heilungsprozess kommen kann, da der Knochenaufbau nur im entzündungsfreien Intervall abläuft. Um die Keimlast zu eradizieren, werden Antibiotika je nach erwartetem Keimspektrum lokal appliziert, z.B. mit Antibiotika beladenen Knochenersatzmaterialien oder allogenen Knochen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Das Merinoschaf stammt ursprünglich aus Nordafrika und wurde von den Berbern als Nutztier gehalten. Bei den Versuchstieren in dieser Studie handelt es sich um 24 weibliche, nicht-trächtige Merinolandschafe im Alter von durchschnittlich 5,04 (3,6-7,4)Jahren, deren Körpergewicht zum Operationszeitpunkt durchschnittlich 87,27 kg (73-118) betrug.

2.2. Zu testendes Material: Kalzium-Titanat-Implantate

Die offenporigen Implantate aus einer Titanlegierung (Ti6Al7Nb) (Abbildung 1) wurden im Gießerei-Institut der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, im Rahmen eines DFG-Projektes, über ein Wachs- und Gießmodell unter luftdichter Atmosphäre gegossen und abschließend bei 900 °C gebrannt (HAGEMANN, 2012). Dies geschah unter Berücksichtigung der Bedingungen für Gießtechnik nach HERFURTH (2002). Die geforderte Größe lag bei einem Durchmesser von 10mm und einer Länge von 12mm. Die angestrebte Porosität von 20-30 ppi wurde jedoch nicht erreicht und lag schließlich bei 10ppi.

In der Drehbank wurden die Implantate zu Zylindern geformt und konnten anschließend durch die Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) in Berlin mittels einer Reaktionsschicht aus Kalzium-Titanat mit Hilfe eines Salzbad aus 46 Mol% Ca(NO₃)₂, 27 Mol% NaO₃ +27 Mol% KNO₃ bei 360 ° für 2 h nach dem Erfinder PICKFORD (2006) funktionalisiert werden: In einer Lösung (4 M Salpeter- und 0,5 M Flusssäure) (GRADINGER et al. 2006) unter Strom wandern an der Metalloberfläche Ionen (Anode) ab, sodass die Außenseite des Titans ohne weitere chemischen Vorgänge abgetragen wird (Elektropolieren). Dies wird auch als elektrolytisches Ätzen bezeichnet (POHL, 2004). Durch dieses Elektropolieren werden Matrices glatter und runder. Diese umgekehrten galvanischen (Ätz -)Vorgänge führen zu einer Abtragung des Materials um 0,75 µm/ Minute (POHL, 2004).

Die Prüfung und Charakterisierung (Mikrostruktur und mechanische Testung) des Materials wurde an der Universität Siegen und der Fachhochschule Osnabrück durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Kalzium-Titanat-Implantate in vivo im Schafstiermodell evaluiert. Die Versuchstiere wurden entsprechend in eine

„funktionalisierte“, das heißt mit Kalzium-Titanat beschichtete Implantat-Gruppe und eine „unfunktionalisierte“, das heißt unbeschichtete Implantat-Gruppe, eingeteilt (s. 2.3.1.).

2.3. Versuchsdurchführung

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projektnummer: DFG AZ SCHN 976/1-2) gefördert. Die Ethikkommission des Regierungspräsidiums Darmstadt hat den Versuchen (nach §8, Absatz 1 des Tierschutzgesetzes mit der Bekanntgabe vom 18.05.2006 (BGBl.IS. 1206)) mit der Entscheidung vom 23.03.2011 mit dem Aktenzeichen V54-19c20/15- F31/31 zugestimmt.

2.3.1. Randomisierung

Vor der Operation der Tiere wurden diese randomisiert in vier Versuchsgruppen eingeteilt: mit jeweiligen Gruppengrößen von zwölf Tieren in zwei Gruppen (sechs funktionalisiert und sechs unfunktionalisiert) für die Histologie und zudem in zwei Gruppen (ebenfalls sechs funktionalisiert und sechs unfunktionalisiert) für die Biomechanik. Um die osteokonduktive Wirkung der Implantate zu überprüfen, ist es wichtig, eine Defektgröße zu wählen, die das Individuum zu Lebzeiten aus körpereigener Kraft nicht wieder auffüllen kann (*critical size defekt*). Aus diesem Grund wurde ein Defekt mit der Größe von 10 mm Durchmesser und 12 mm Tiefe gesetzt.

2.3.2. Haltung und Fütterung

Die Tiere wurden nach den European Guidelines (DE 86/609/CEE) gehalten. Drei Wochen vor dem Versuchsvorhaben wurden die Schafe in der zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) der Universität Frankfurt untergebracht, so dass sie sich an die neue Umwelt gewöhnen konnten (Einstellung) und etwaige Erkrankungen (auf Chlamydien und Rickettsien wurde standardmäßig getestet), welche das Experiment hätten beeinflussen können, von den ansässigen Tierärzten diagnostiziert worden wären. Zwölf Stunden vor der Operation wurden die Tiere auf eine Diät mit Heu und Wasser ad libitum gesetzt.

2.3.3. Präoperative Prämedikation

Die Merino-Landschafe erhielten je eine Injektion Ketamin (10 mg/kg KG, Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und Xylazin (0,1 mg/kg KG, Bayer, Leverkusen, Deutschland) intramuskulär. Nach erfolgreichem Zugang zu dem venösen und arteriellen System wurde jedem Schaf Propofol (0,4 mg/kg KG) und Fentanyl (0,5 mg/kg KG) zur Narkotisierung appliziert. Analog zur menschlichen Anästhesie wurden die Tiere nach Intubation maschinell beatmet und ihre Vitalzeichen (Herzfrequenz, Blutdruck, O₂-Saturation und Blutgase) kontinuierlich überwacht. Um eine Austrocknung der Cornea zu vermeiden, wurde eine Augensalbe appliziert. Zum Schutz vor Infektionen unter der Operation wurde gewichtsadaptiert perioperativ ein Antibiotikum (Veracin-compositum, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) 3 ml/50kg) verabreicht.

2.3.4. Anatomie des OP-Gebietes

Das Femur zählt zu den langen Röhrenknochen und lässt sich makroskopisch in drei Bereiche einteilen: An die Epiphyse, welche im proximalen Bereich des Femurkopfes anzutreffen ist, schließt sich die Diaphyse, der Knochenschaft, an. Die distale Epiphyse des Femurs artikuliert mit der Tibia und der Patella im Kniegelenk. Als Implantationsort wurde die distale Epiphyse, die Femurkondyle, gewählt.

2.3.5. Einbringen der Implantate

Nachdem die Tiere in die Rückenlage gebracht und alle Gliedmaßen am Operationstisch fixiert wurden, folgten die Enthaarung durch Pilca (DMV Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co. KG, Bad Pyrmont, Deutschland) sowie ein steriles Abdecken mit einer nachfolgenden Desinfektion mittels universeller Iod-Lösung. Anschließend erfolgte ein medialer Hautschnitt von ca. 4 cm Länge in Höhe der Femurkondyle (Abbildung 2) mit darauffolgender Spaltung der Fascia genu mittels Skalpell sowie das Freipräparieren des Periostes an der medialen Femurkondyle unter Nichteröffnung der Gelenkkapsel des Knies. Fingerbreit, mittig distal einer gedachten Linie zwischen oberer Kante des Patella-Gleitlagers und Oberkante der Kondyle, wurde das Diamond Bone Cutting System (DBCS, Firma Biomet, Darmstadt, Deutschland) - unter ständiger Kühlung mit NaCl - genutzt. Dieses Bohrsystem erlaubt definierte zylinderförmige Defekte, ohne Hitzenekrosen im Defektareal auszulösen. Die gesetzten Defekte entsprachen einer Tiefe von 12mm bei einem Durchmesser von 10mm und der entstandene Knochenzylinder wurde mit einem Extraktor (Abbildung 3) entnommen. Anschließend wurde entweder ein funktionalisiertes oder ein nicht funktionalisiertes Implantat *press-fit*

in den Defekt eingebracht. Bei einem der operierten Tiere verblieb der Defekt leer, da eine Verankerung des Implantates nicht möglich war.

Die Faszie wurde mit resorbierbarem (Vicryl Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland), die oberflächliche Wunde mit nichtresorbierbaren Nahtmaterial (Biosyn, 2-0 USS DG, Norwalk, USA) verschlossen und schließlich ein antiseptischer Sprühverband (Nobecutan-Spray, Astra, Wedel, Deutschland) appliziert (Abbildung 4).

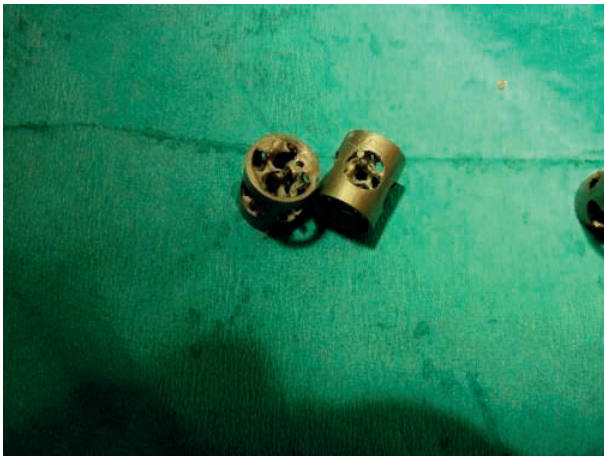


Abbildung 1: (Foto) Unfunktionalisiertes Implantat

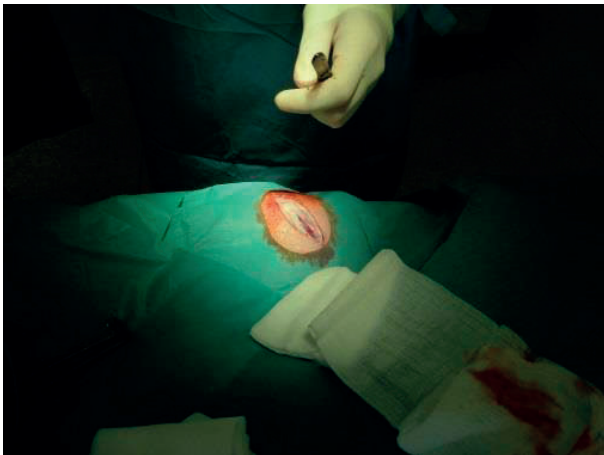


Abbildung 2: (Foto) Eröffnung des OP-Gebietes: Spaltung der Fascia genu

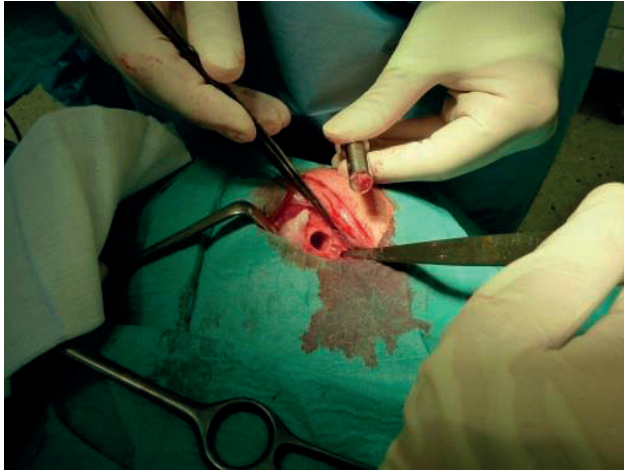


Abbildung 3: (Foto) Entnahme des Bohrzyinders mit einem Extraktor



Abbildung 4: (Foto) Verschluss der Wunde

Die Abbruchkriterien des Versuchsdurchganges waren präoperativ vorhandene Infektionen im Operationsgebiet, Gewichtsverlust von mehr als 15 %, Apathie und/oder Verweigerung der Futteraufnahme, Penetration des Implantates durch das Weichteilgewebe sowie starke Bewegungseinschränkungen der betroffenen hinteren Gliedmaße.

2.3.6. Postoperativ

Die schonende und wärmeregulierte Aufwachphase wurde durch einen hohen Strohfüllungsgehalt in den Aufwach-Boxen gewährleistet. Da nach VUOLTEENAHÖ et al. (2008) durch die Gabe von nichtsteroidalen antiinflammatorischen Wirkstoffen eine Beeinflussung des Versuchsergebnisses durch Hemmung der Osteoblasten

anzunehmen ist, wurde bewusst zur Schmerzregulierung alle 12 Stunden ein Opiat verwendet (Buprenorphin, 0,001-0,01 mg/kg KG. Keines der Tiere wies im postoperativen Verlauf eine Lahmheit oder Apathie auf.

2.3.7. Polychrome Sequenzmarkierung

Um die Knochenneubildung chronologisch innerhalb des Defektbereiches zuzuordnen und rekapitulieren zu können, wurden 12 für die Histologie vorgesehenen Schafen in verschiedenen zeitlichen Abständen Fluorchrome verabreicht (Abbildung 5), welche eine Vitalfärbung des Knochens nach sich ziehen (polychrome Sequenzmarkierung). Fluorchrome bilden während der Neusynthese des Knochens Chelate mit dem knocheneigenen Kalzium, sodass eine Observierung des appositionellen Wachstums nach Einbettung in Methylmethacrylat (Technovit 9100neu, 2.6.2.) möglich ist. Da die Chelate in unterschiedlichsten Wellenlängen lumineszent sind sobald sie mit ultraviolettem Licht bestrahlt werden, lassen sie somit eine zeitliche Zuordnung ohne vorzeitiges Euthanasieren der Tiere zu. Die Farbstoffe wurden allen Tieren subkutan und gewichtsadaptiert verabreicht:

- Oxytetracyclin (Terramycin®/ LA, Pfitzer, New York, USA), 25 mg/kg KG

Tag 28 und 35 post operationem, Fluoreszenz: Gelb

- Alizarin complexone (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 20 mg/kg KG.

Es wurde eine 3 %ige sterile Lösung mit 2% Natriumhydrogencarbonat in aqua ad inj. mit einem pH-Wert von 7,4 hergestellt. Tag 105 post operationem, Fluoreszenz: Rot

- Calcein (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 7,5 mg/kg KG.

Es wurde eine 3 %ige sterile Lösung mit 4% Natriumhydrogencarbonat in aqua ad inj. mit einem pH 7,4 von hergestellt. Tag 176 und 183 post operationem, Fluoreszenz: Grün.

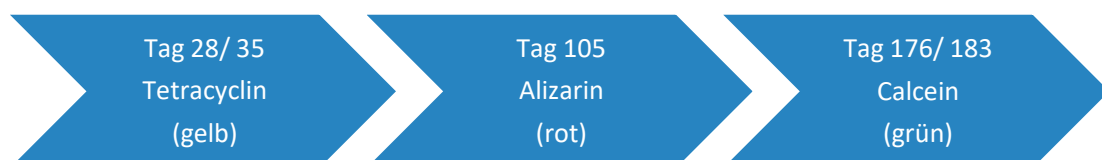


Abbildung 5: polychrome Sequenzmarkierung

2.3.8. Euthanasie und Materialentnahme

Nach sechsmonatiger Standzeit wurden die 24 Tiere euthanasiert und der jeweiligen Versuchsreihe zugeteilt (Tabelle 6). Über eine tiefe Narkose in Spontanatmung mit 10%igem Ketamin und Xylazin intramuskulär und unter veterinärmedizinischer Überwachung erfolgte die Tötung der Tiere mittels einer intravenösen Gabe von Pentobarbital. Nach Feststellung des Todes wurde die Versuchsdurchführung fortgesetzt:

Bei zwei Tieren wurde in tiefer Narkose für die Elektronenmikroskopie zuerst das Operationsgebiet rasiert und eine Inzision in Höhe der Arteria und Vena femoralis gesetzt um diese von der proximalen Blutzirkulation abzutrennen. Die Vena femoralis wurde eröffnet und mit körperwarmer 0,9% NaCl-Lösung gespült wodurch die sich anschließende Perfusion mit körperwarmen Paraformaldehyd 4% (Merck, Darmstadt, Deutschland) möglich wurde.

Bei den restlichen 13 Versuchstieren (Tabelle 6) erfolgte nach Abtrennung des distalen Femurs von der Diaphyse mit einem Elektro-Fuchsschwanz (Ferm, 600D, Niederlande), die Ablösung der Kondylen im Kniegelenk (Abbildung 6 und 7). Mit Hilfe einer Knochensäge (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) wurden die Kondylen von medial aus in 5-6 Scheiben gesägt

Die Versuchstiere wurden wie folgt aufgeteilt (Tabelle 6): 11 für die Biomechanik, 13 für die Histologie, incl. 2 für die Rasterelektronenmikroskopie und 11 für die Molekularbiologie.

Tabelle 6: Einteilung der Versuchstiere

Tier	Implantat	Histologie	Bio-mechanik	REM Perfusion	Molekular- biologie
1	U		X		
2	F		X		
4	U		X		
5	F		X		
6	U	+			+
7	F		X		
8	Leer	+			+
9	F		X		
10	U	+			+
11	F	+			+
12	U	+		X	
13	F		X		
14	U	+			+
15	F	+			+
16	U	+			+
17	F		X		
18	U		X		
19	F	+			+
20	U		X		
21	F	+			+
22	U		X		
23	F	+			+
24	U	+			+
25	F	+		X	

U= Unfunktionalisiert, F=Funktionalisiert, REM =Rasterelektronenmikroskopie

+ ist Gegenstand dieser Arbeit (n=11), x wird in einer weiteren Dissertation bearbeitet (n=13)

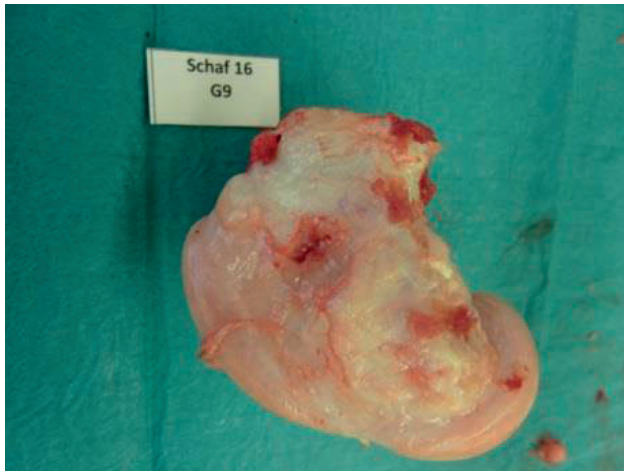


Abbildung 6: (Foto) Femurkondylen nach Trennung von der Diaphyse

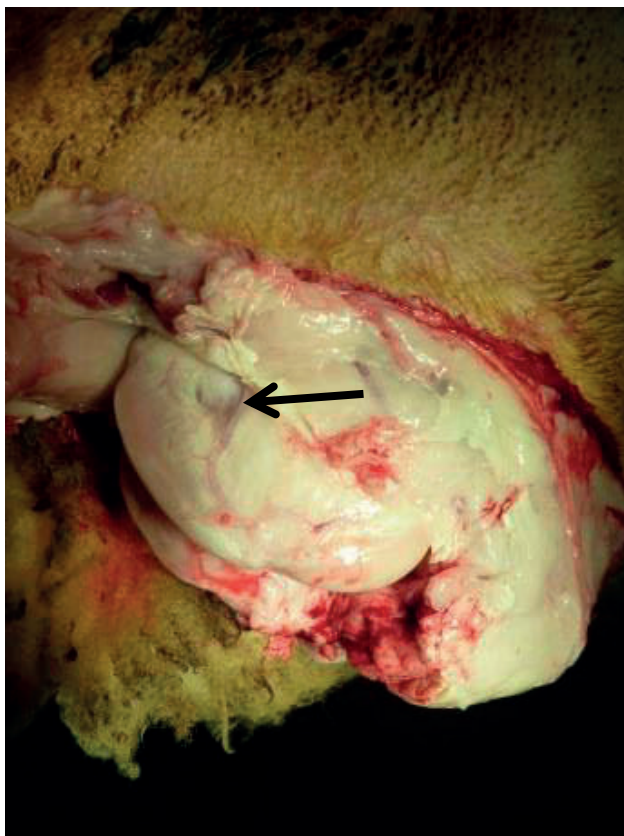


Abbildung 7: (Foto) Femurkondyle mit Implantat (Pfeil)

Unmittelbar darauf wurden die Knochenscheiben in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert, um diese später unentkalkt in Technovit® 9100neu einzubetten und für die histologische Evaluation Dünnschliffe herzustellen (2.4.2.). Die erste Scheibe der nicht perfusionsfixierten Knochen wurde für spätere molekularbiologische Untersuchungen in RNALater (Qiagen, Valencia, Kanada) eingelegt.

2.4. Schliffherstellung mittels Trenn-Dünnschliff-Technik

2.4.1. Exakt-Trennschleifsystem

Die Knochenscheiben wurden unentkalkt in Technovit®9100neu eingebettet. Zur Herstellung von Dünnschliffen nach DONATH et al. (1988) wurden unten aufgelistete Maschinen, Hilfsgeräte und Verbrauchsmaterialien benötigt:

Maschinen:

- Exakt-Trennschleifsystem (Abbildung 8)
- Exakt-Mikro-Schleifsystem

Hilfsgeräte:

- Exakt-Vakuum-Klebevorrichtung zur planparallelen Aufblockung
- Exakt Präzisionsklebepresse (Objekttägermontage)
- Kulzer-Exakt-Lichtpolymerisationsgerät
- Mikrometerschraube mit Digitalanzeige
- Fühllehre
- Haarlineal

Verbrauchsmaterialien:

- Technovit9100Neu als Einbettungsmedium
- Präzisionskleber
- Fixationskleber
- Einbettmulden
- Plexiglas-Objektträger
- Schleifpapier
- Glykolmeracetat

Wie in Abbildung 8 dargestellt, wurde mit Hilfe eines Stahlbandes, welches mit Diamant- oder Bornitridkörnern beschichtet ist, zunächst die distale Femurkondyle bearbeitet. Das Trennschleifsystem arbeitet mit der sogenannten Trenneinheit (DONATH, 1988) ähnlich einem Sägeband. Damit es nicht zu Gewebeschäden kommt, besitzt diese Maschine eine Kühl- und Spülvorrichtung. Ähnlich wie bei einem Schraubstock wird das Präparat in der gewünschten Position fixiert und wandert mit gleichmäßiger Geschwindigkeit durch das Sägeband (Abbildung 8). Dies wird durch ein variierbares Gewicht ermöglicht, welches mit kontinuierlichem Zug das Präparat, ähnlich einem Schlitten, durch die Trenneinheit hindurch bewegt.

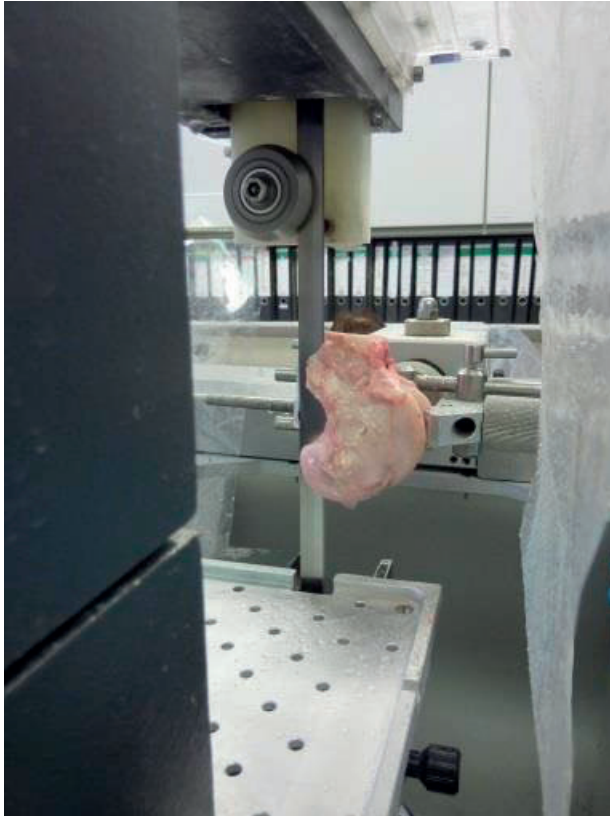


Abbildung 8: (Foto) Exakt Trennschleifsystem

Unter ständiger Kühlung (H₂O) wird die Femurkondyle mit dem Exakt Trennschleifsystem (DONATH, 1988) in 5-6 Scheiben gesägt



Abbildung 9:(Foto) Femurkondyle mit freigelegtem Implantat

Die Auftrennung des Knochens erfolgte analog zu den Körperachsen sagittal, senkrecht zur Implantationsachse. Es wurden zunächst aus jeder rechten Femurkondyle 5-6 Knochenscheiben gesägt (Tabelle 7; Abbildung 9 und 10). Scheibe Nr. 1 der perfusionsfixierten Knochen wurde für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet

(nicht Gegenstand dieser Arbeit), während die erste Scheibe der übrigen für die Histologie bestimmten Knochen für die Molekularbiologie in RNAlater (Qiagen, Valencia, Kanada) verbracht wurden. Die restlichen Scheiben wurden in 4% gepuffertem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) immersionsfixiert.

Tabelle 7: Knochenscheiben

Scheibe I	Rasterelektronenmikroskopie (perfusionsfixierte Tiere) oder Molekularbiologie
Scheibe II-IV	Einbettung in Technovit9100Neu
Scheibe V bzw. VI	Reserve und Testmaterial

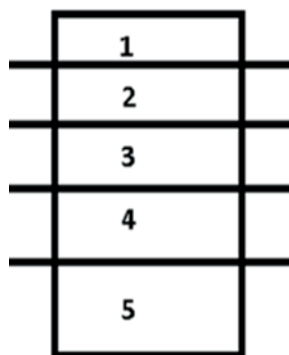


Abbildung 10: Schema Implantat

Hier ist schematisch das zylindrische Implantat dargestellt und in welcher Höhe jeweils welcher Schliff zu finden ist.

2.4.2. Technovit9100Neu und Exakt-Mikroschleifsystem 400 CS

Zunächst wurden die Präparate in 4%iger Paraformaldehyd- Lösung nach Lilli (Tabelle 8) fixiert und anschließend sechs Mal mit 0.1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,2-7,4) gespült um dann in Ethanol entwässert. Hierbei ist es von Belang, dass dies in aufsteigender Alkoholreihe (Tabelle 8, Punkt 3) in einem Zeitraum von 28 Tagen geschieht. In einem Xylol-Bad wurde das Untersuchungsmaterial erneut auf den Rüttler morgens und abends gestellt. Nach einer 14-tägigen Präinfiltration verblieb das biologische Material schließlich für 11 Tage in der Infiltrationslösung. Anschließend erfolgte die Polymerisation für zwei Tage im Exikator bei 4° in ovalen Kunststoffförmchen, die mit Parafilm (SigamaAldrich, ST. Louis, USA) unter Luftabschluss abgedeckt wurden, mit Technovit9100Neu (Abbildung 11).

Tabelle 8: Einbettung in Technovit9100Neu

1. Fixieren	In 4% Paraformaldehyd nach Lilli (4% Paraformaldehydlösung in 0,1M Na-Phosphatpuffer pH 7,2-7,4)
2. Spülen	6x spülen mit 0,1 MNa-Phosphatpuffer pH 7,2- 7,4
3. Entwässern in vergälltem (denaturiertem) Ethanol	In aufsteigender Ethanolreihe unter Rütteln zur Denaturierung: 4 Tage in 70 %igem Alkohol 3 Tage in 80 %igem Alkohol 3 Tage in 96 %igem Alkohol 14 Tage in 100 %igem Alkohol
4. 1x 100 Ethanol p.a.	4 Tage in 100 %igem Alkohol
5. Xylol	Morgens und abends unter Rütteln
6. Präinfiltration I-III	I: stabilisierte Basislösung mit Xylol im Verhältnis 1:1 II: stabilisierte Basislösung und Härter 1 im Mischungsverhältnis 400 ml und 2 g Härter 1 III: entstabilisierte Basislösung und Härter 1 im Mischungsverhältnis von 250 ml Lösung und 1,25 g Härter 1
7. Infiltration	400ml entstabilisierte Basislösung vermengt mit 20g Pulver 2 und 1,6g Härter 1
8. Polymerisation	Die in Kunststofförmchen platzierten Präparate werden mit Technovit9100Neu übergossen und anschließend für 2 Tage bei -4°C polymerisiert.

**Abbildung 11: (Foto) Knochenschliff**

Knochenschliff während der Polymerisation (Tabelle Nr. 8) in einer ovalen Kunststoffform, abgedeckt mit Parafilm in Technovit9100Neu. Die Polymerisation erfolgte für zwei Tage bei -4°C.

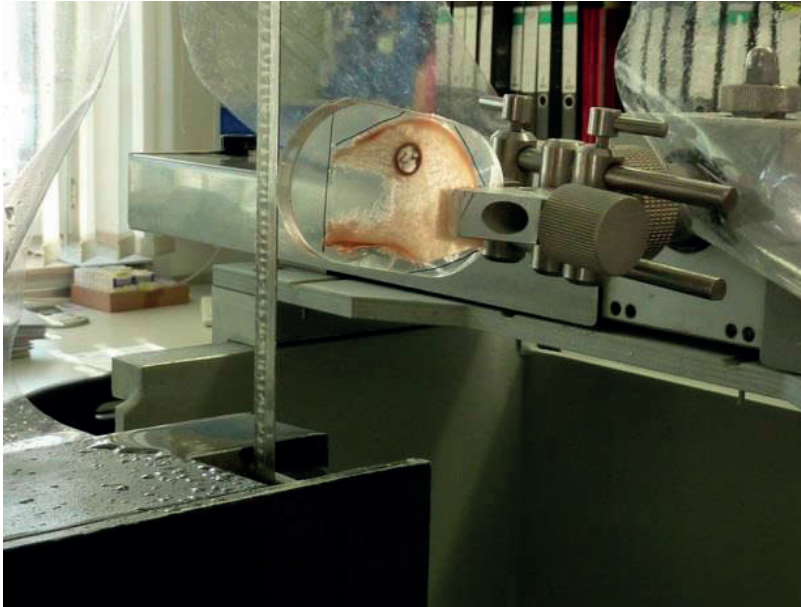


Abbildung 12: (Foto) Exakt- Trennschleifsystem 310CL

Nach Markierung des überschüssigen Einbettmaterials erfolgte das Absägen desselbigen mittels Exakt-Trennschleifsystem 310CL.



Abbildung 13:(Foto) Zuschnitt Präparat

Fertig zugeschnittenes Präparat, bevor es von beiden Seiten mit Hilfe von T4000 auf jeweils einen Objektträger angebracht wurde.

Um die eingebettete Probe herum wurde überschüssiges Einbettmedium abgesägt (Abbildung 12 und 13). Nun konnte in „Sandwichtechnik“ das beidseitige Aufbringen bzw. Kleben der Blöcke auf Objektträgern mittels T4000 (Energy Beam Sciences, East, Granby, USA, Nr. 66064414) erfolgen. Wieder kam das Exakt –Trennschleifsystem 310 CL zum Einsatz und trennte das Objektträger-Präparat-Objektträger-Sandwich in zwei Teile, von denen ein Teil ungefähr die Dicke von 200µm haben sollte und anschließend weiter zu einem Schliff verarbeitet wurde. Der restliche Teil wird wieder mit einem neuen Objektträger zu einem Sandwich verklebt und gesägt, so dass auf diese Weise 3 bis 4 Schliffe entstanden, die schließlich mit dem Exakt Mikroschleifsystem 400 CS (Exakt-Apparatebau) mittels Schleifpapier (Diapuls, Oststeinbrück, Deutschland) auf eine Enddicke von ca. 50µm dünn geschliffen und poliert wurden. Eine Verifikation der Schliffdicke erfolgte mit Hilfe einer Mikrometerschraube mit Digitalanzeige. Hierbei wurde an vier verschiedenen Stellen gemessen und die höchste Messzahl notiert.

2.5. Histologische Bearbeitung

2.5.1. Färbung mit Toluidinblau

Die Knochenschliffe wurden für 2 x 20 Minuten in MEA (2-Methoxyethyl-acetat, Merck, Darmstadt, Deutschland, Nr. 8.06021.1000) entplastet und anschließend in Aceton (für 2 x 5 Minuten) und einer Aceton/Aqua-dist. Mischung im Verhältnis 1:1, für 5 Minuten rehydriert. Anschließend wurde Toluidinblau (Toluidinblau O - Pyronin G nach Prof. DONATH 8mg di-Natriumtetraborat Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 1.06306 + 8g Toluidinblau O, Chroma (Waldeck GmbH, Münster, Deutschland, Nr. 1B 481) auf 800ml Dest vermischt mit 2g Pyronin G, Merck Darmstadt, Deutschland Nr. 7518 auf 200ml Aqua dest) durch einen Spritzenfilter auf den Objektträger aufgetropft. Der Filter ist insofern wichtig, damit keine ungelösten Farbstoffe auf das Präparat gelangen können und somit keine Farbstoffniederschläge entstehen. Die Knochenschliffe entwässerten in einer aufsteigenden Alkoholreihe und für zwei mal 10 Minuten in Xylol. Abschließend wurden die Präparate mit Eukitt (Orsatec GmbH, Bobingen, Deutschland) eingedeckt. Toluidinblau (Abbildungen 14 a und b) erlaubt die Beurteilung des mineralisierten und unmineralisierten Knochens sowie des Weichgewebes durch unterschiedliche Blautöne. Knorpelmatrix und Mastzellgranula stellen sich rotviolett dar (Metachromasie). Das Weich- und Hartgewebe lässt sich somit gut differenzieren.

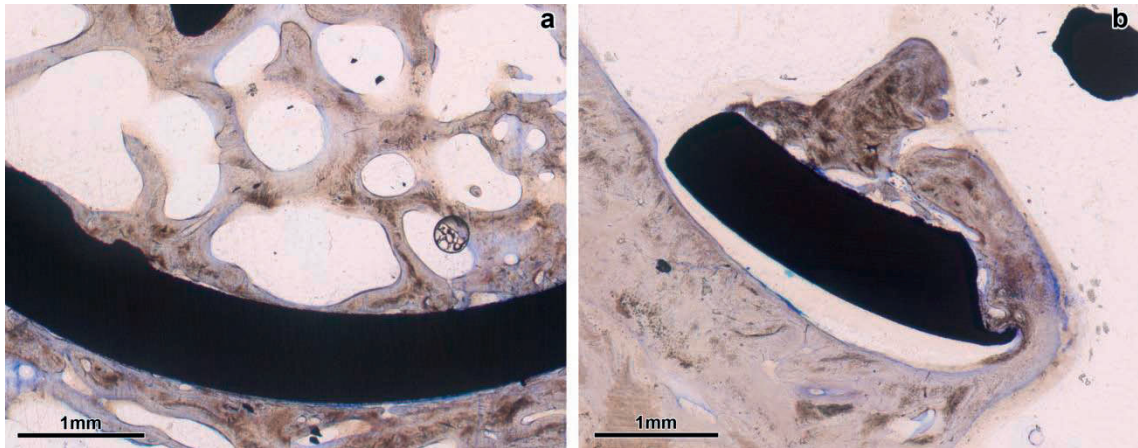


Abbildung 14a und b: Histologie: Toluidinblau

a.:Schaf 24 - unfunktionalisiertes Implantat (schwarz), Schliff II mit Toluidinblaufärbung; b.: Schaf 21 – funktionalisiertes Implantat (schwarz).

2.5.2. Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das Phosphat z.B. von Proteinen oder Nukleotiden im alkalischen Bereich abspaltet. Dieses Enzym wird von Osteoblasten sezerniert, seine Expression belegt somit indirekt deren Aktivität. Bei diesem Nachweis kommt es zu einer farbigen Reaktion, die in Abbildung 16 dargestellt ist. Hier sind die Osteoblasten blau-violett angefärbt. Zu Beginn werden die Präparate in (2-Methoxyethyl)-Acetat (MERCK No. 8.06021.1000) in Küvetten für 3 in MEA und anschließend für 2 x 5 Min. in Aceton entplastet. Sie werden anschließend in einer 1:1-Mischung aus 500ml Aceton und 500ml Aqua dest. für 2 x 5 Min rehydriert. Um ein Verlaufen der Substratlösung zu verhindern wurden die Präparate mit dem Pap-Pen (Abcam, UK) eingekreist und dann in Tris-Puffer für 10 Minuten inkubiert. Die Stammlösung des Puffers bestand aus 121,1 g Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf 1 L Aqua dest. Dies entsprach einer einmolaren Lösung mit einem pH- Wert von 9,4. Zur Benutzung wird dieser auf 0,1M mit Aqua dest. verdünnt.

Zur Darstellung der endogenen Alkalischen Phosphatase wurde ein Substrat (BCIP/NBT, KPL, Maryland, USA) verwendet, welches mittels Spritze und Millipore-Filter auf die Knochenschliffe aufgetragen wurde. Nach 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37 °C, wurde die Färbeintensität mit einem Lichtmikroskop verifiziert (Abbildung 16). Vor dem Eindeckeln mit DePeX (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland, Nr. 18243.01) erfolgte schließlich die Entwässerung der Schliffe mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol (Abbildung 15).

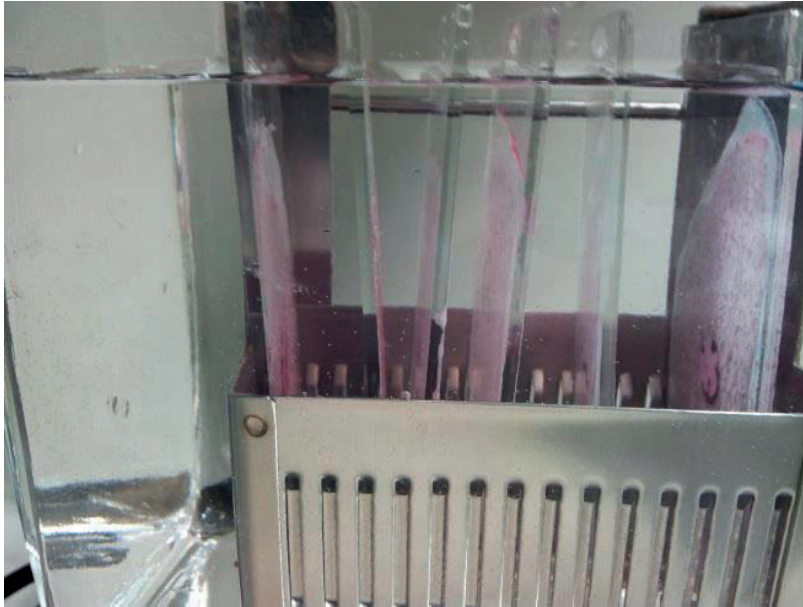


Abbildung 15: (Foto) Rüttler

Die Präparate mit Nachweis der alkalischen Phosphatase auf dem Rüttler in aufsteigender Alkoholreihe.

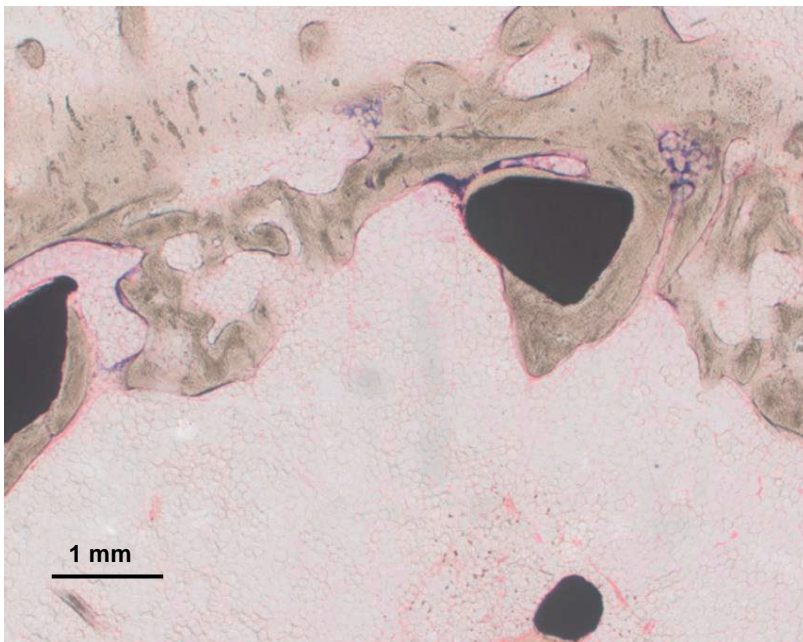


Abbildung 16: Histologie: Alkalische Phosphatase

Schaf 25 mit funktionalisiertem Implantat (schwarz) Schliff II. Die Osteoblasten-spezifische alkalische Phosphatase ist blau-violett angefärbt.

2.5.3. Nachweis von Alpha-Smooth-Muscle-Actin (α -SMA)

Alpha- Smooth- Muscle -Actin (ASMA) ist ein Antigen, welches sich gegen Aktine richtet und diese somit in histologischen Schnitten anzeigen kann. Aktine sind Teil des Zytoskeletts von Myofibroblasten, welche eine zentrale Rolle bei der vaskulären Neogenese und dem Wundverschluss durch die Wundkontraktion spielen (SKALLI et al. 1986; DESMOULIÉRE et al. 2005). Da sie ebenfalls in den Wänden von Kapillaren und Venolen zu finden sind, in diesem Fall als Perizyt bezeichnet, dient ihr Nachweis dem indirekten Vorkommen von Gefäßen und damit der Perfusion vitalen (Knochen-)Gewebes. In Abbildung 17 lässt sich ein rot angefärbtes Gefäß innerhalb des Fettgewebes nahe der Bohrkante erkennen. Durch die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin erscheint kalzifiziertes Gewebe blau- violett.

Zunächst wurden die Objektträger für 2 x 5 Minuten mittels (2-Methoxyethyl-)Acetat (MERCK No 8.06021.1000) entplastet und anschließend mit 100% Aceton (2 x 5 Minuten) und einer Mischung aus Waschpuffer/Aceton (Tris-NaCl-Puffer [0,05mol/l Trizma Base, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, T6066 + 1,5mol/l NaCl, Roth, Karlsruhe, Deutschland 3957.1, pH 7,4], TBS 1:1, 2 x 5 Minuten) und reinem Waschpuffer für 3 x 5 Minuten rehydriert. Diese Schritte fanden alle auf einem Rüttler und bei Raumtemperatur statt. Darauf folgte die Blockierung der endogen im Gewebe vorkommenden Peroxidase mit 6% H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 8.22287) in TBS für 45 Minuten bei Raumtemperatur bei leichter Bewegung auf einem Rüttler. Die Schliffe inkubierten nach weiteren Spülschritten in TBS (3 x 5 Minuten) für 60 Minuten mit dem primären Antikörper gegen α -SMA (DAKO, Hamburg Deutschland, Nr. M0851) in einer Verdünnung von 1: 1000 in Verdünnungspuffer (DAKO, Hamburg, Deutschland, Nr.S3022) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Um unerwünschte Bindungen des Sekundärantikörpers zu vermeiden, erfolgte nach weiteren Spülschritten in TBS (3 x 5 Minuten) die Inkubation in einem Blockierpuffer aus TBS, 1% BSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, A3912) und 12,5 % Schafserum (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Nr. S2263) für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Daran schloss sich die Inkubation der Schliffe in einem Polymer (DAKO Envision, Dako, Hamburg, Deutschland, K4006) für 30 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur, in einer feuchten Kammer, an. Nach jeweils zwei Waschschritten für 5 Minuten in Waschpuffer und destilliertem Wasser folgte die Visualisierung der Reaktion mit DAB+ (DAKO Envision, Hamburg, Deutschland, K4006, 1ml DAB, Substratpuffer und 1 Tropfen DAB Chromogen). Nach Spülschritten in destilliertem Wasser, der Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Fa. THERMO Scientific, Pinneberg, Deutschland, No. 6765015) für 30 Sekunden, dem 10-minütige „Bläuen“ unter Leitungswasser und einem

weiteren Spülschritt in destilliertem Wasser, wurden die Schliffe in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe und Xylol entwässert sowie mit DePeX (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland, Nr. Nr. 18243.01) eingedeckelt.



Abbildung 17: Histologie: Immunhistochemie Anti- α -SMA -AK

Schaf 12 nahe der Bohrkante unfunktionalisiertes Implantat. Gefäße werden mittels ASMA rot angefärbt. Gegenfärbung: Hämatoxylin.

2.5.4. Foto-Dokumentation histologischer und immunhistologischer Schnitte

Die Schliffe wurden mit dem Lichtmikroskop der Firma Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena) mit Fotoaufsatz Axiophot 2 (Zeiss, Göttingen, Deutschland) und der Kamera DC 500 (Leica Microsystem, Wetzlar) mit Hilfe der Software IM1000 (Leica, Wetzlar, Deutschland) digitalisiert und gespeichert. Die Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem Filtersatz 25 (Exzitation: 410/505/585, Emission:460/530/610; Carl Zeiss, Nr. 487925 Jena, Deutschland) realisiert. Um den gesamten Defektbereich auf eine Abbildung zu bekommen, wurden mäanderförmig mit dem 2,5-fachen Objektiv Serienaufnahmen aufgenommen und anschließend mit Photomerge von Photoshop CS5 extended (Adobe, San Jose, USA) unter interaktiver, manueller Kontrolle zusammengesetzt.

2.6. Messverfahren

2.6.1. Histomorphometrie

Die Histomorphometrie wurde benutzt, um die quantitative Messung von Knochengewebe während des Remodelling zu analysieren. Sie kann zwei- bis dreidimensionale histologische Strukturen aufarbeiten, sodass am Ende eine statistische Aussage über die Ergebnisse getroffen werden kann (LANG, 2013). Knochendichtemessungen oder biochemische Knochenmarker sind im Vergleich zur Histomorphometrie nicht in der Lage, eine präzise Charakterisierung des Knochenumsatzes zu liefern (COMPSTON, 1998). Bei der vorliegenden Arbeit wurde quantitativ der Knochenumsatz im Bereich des *Interface* zwischen Implantat und Knochen evaluiert, wobei dies die Knochenneubildung betreffend anhand der postoperativen applizierten Fluorchrome geschah, welche eine zeitabhängige Erhebung des Remodellings erlaubten. Für die vorliegende Doktorarbeit wurde nur die Fluoreszenz Alizarin manuell mittels Photoshop (Adobe Photoshop CS5 extended) gemessen. In Abbildung 18 und 19 ist beispielhaft aufgeführt, wie das Präparat vor und nach der Messung aussieht. Die rote Farbe wurde aus didaktischen Gründen und zwecks Messung der Fläche gewählt.

Als *Area of Interest* (AOI) wurde der Durchmesser des Implantates um 100 pixel (entspricht 0,4 mm) vergrößert (Abbildung 18), um die Implantatregion inklusive der Interfaceregion zum Lagerknochen beurteilen zu können. Um aufgrund unterschiedlicher Implantat-anschnitte eine zwischen den Schliffen vergleichbare Fläche als Berechnungsgrundlage zu erhalten, wurde die Ausdehnung des Implantates gemessen (Abbildung 18) und vom AOI abgezogen. Die so erhaltene Fläche wird im Folgenden als "biologisches Material (BM)" bezeichnet und gleich 100% gesetzt. Die Messung von Knochen, alkalischer Phosphatase oder Alizarin-gefärbter Knochenanteile können somit als Anteile des BM im mm² berechnet und verglichen werden.

„Injektion in %“ bezeichnet den neugebildeten Knochen zum Zeitpunkt der Injektion in Prozent; dies errechnet sich mittels Dreisatz in Bezug zum biologischen Material und Alizarin. In einer anderen Arbeit fand eine statistische Auswertung des Fluorchromes Calcein statt.

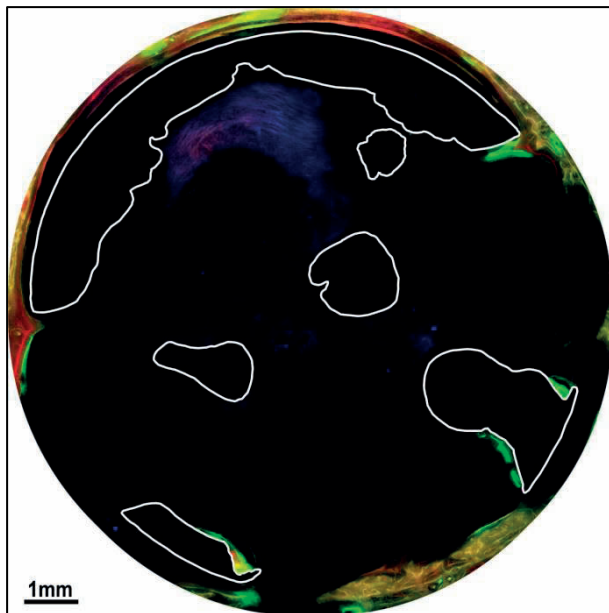


Abbildung 18: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 21 funktionalisiertes Implantat: vor der Bestimmung der Fluoreszenz Alizarin: noch nicht manuell gemessene Fläche der Fluoreszenz und des Implantates (weiß umrandet). Hier ist deutlich Alizarin (rot) vor der manuellen Messung, zu erkennen. Das Implantat und die Interface-Region als Vergrößerung des Defektes um 100 pixel definiert die AOI durch seine kreisförmige Struktur.

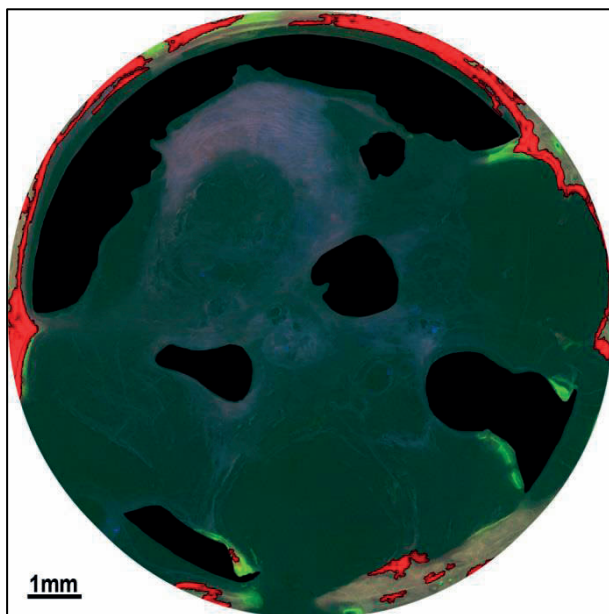


Abbildung 19: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 21 funktionalisiertes Implantat: Alizarin (rot) nach der manuellen Messung. Das Implantat (schwarz) und die Interface-Region als Vergrößerung des Defektes um 100 pixel definiert die AOI durch seine kreisförmige Struktur.

2.6.2. Statistik

Bei der statistischen Auswertung wurden die gemessenen Daten im Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Firma Microsoft, Seattle, USA) gespeichert. Nach der Datenauswertung mit der SPSS-Software (SPSS, Chicago, Ill, USA) mittels Kruskal-Wallis- (H-Test, parameterfrei) und Mann-Whitney-Test (U-Test, parameterfrei), konnten die gesammelten Ergebnisse als sogenannte Box-Whiskers-Plots dargestellt werden. Bei diesen Plots können unterschiedliche Streuungs- und Lagemaße graphisch visualisiert werden.

Die Ergebnisse werden in sogenannten Box- und Whiskers-Plots (Boxen) dargestellt. Die Box selbst stellt den Bereich dar, in dem 50 % der erhobenen Daten liegen. Die horizontale Linie, die durch die Box zieht, weist den Median auf. Weiter kann zwischen einem oberen (75%) und unteren (25%) Quartil differenziert werden. Die obere Begrenzung der Box entspricht der Abgrenzung zum oberen (>75%) und die untere Begrenzung derjenigen zum unteren (>25%) Quartil. Mittels Whiskers wird der minimalste (0%) und maximalste (100%) erhobene Wert markiert. Abweichende Werte sind mit einer Ziffer und kleinen Kreisen versehen. Als statistisch signifikant galten Werte von $p < 0,05$, welche mit einem Stern versehen wurden. Zwei Sterne stellen hochsignifikante Werte mit $p < 0,01$ dar. Bei einem Niveau von $p > 0,05$, wird das Messergebnis als nicht signifikant gewertet. Bei der vorliegenden Statistik entspricht 0 unfunktionalisierten Implantaten und die Zahl 1 den funktionalisierten Implantaten.

2.7. Molekularbiologie

2.7.1. RNAlater und RNA-Isolation

Wie unter 2.3.7. erwähnt, wurden die nicht perfusionsfixierten Gewebeproben in RNAlater (Qiagen, Valencia, Kanada) eingelegt, sodass eine molekularbiologische Untersuchung ermöglicht wurde. RNAlater inaktiviert über Diffusion die zellulären RNasen, welche sonst die vorhandene RNA binnen kurzer Zeit abbauen würden (JANSOHN et al. 2012). So kann die RNA bei 18-25 °C für sieben oder bei 2-8°C für 28 Tage konserviert werden, ein Transport oder Versand in Trockeneis ist somit ohne weiteres möglich. Bei der vorliegenden Studie wurde die RNA aus Knochengewebe wie folgt isoliert: 100mg des in RNAlater (Qiagen, Valencia, Kanada) tiefgefrorenen Gewebes aus dem *Interface*-Bereich zwischen Lager und Implantat wurde mit einem Ultraturrax unter Zugabe von 1ml QIAzol Lysis Reagent (aus: RNeasy Tissue Lipid Kit,

Qiagen, Hilden, Deutschland, Nr. 74804) zerkleinert. Anschließend folgte die Isolation der RNA nach Herstellervorschriften mit RNeasy Lipid Tissue Kit.

Um die Proben zu homogenisieren wurde das zerkleinerte Gewebe unter der Zugabe von QIAzol Lysis Reagent in den Ultraturax gegeben. Nach einer 5-minütigen Kühlung auf dem Rüttler erfolgt die Phasentrennung unter Zugabe von 200 µl Chloroform in der Zentrifuge. Es konnte so ein Dreiphasiges Eluat gewonnen werden. Eine rote organische Phase ganz unten, in der Mitte eine weiße Schicht (Interphase) und zuletzt oben auf die farblose RNA. Nach der Bindung der RNA mit Ethanol und Puffern (RW1 und RPE) erfolgte schließlich die quantitative Bestimmung des Ribonukleinsäure-Gehaltes mit jeweils 1 µl in einem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland).

2.7.2. Reverse Transkription

Um in vitro die einzelsträngige RNA in die doppelsträngige komplementäre cDNA zu transkribieren, wurde eine Reverse Transkription incl. einer DNase-Behandlung mit dem QuantiTect Reverse Transcriptase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, Nr. 205310) durchgeführt. Um für die spätere PCR für jede Probe eine Negativkontrolle zu erhalten, wurden die Proben doppelt angesetzt (RT+ und RT-) und bei einem Durchgang (RT-) die reverse Trankriptase durch RNase-freies Wasser ersetzt.

Zur Elimination der genomischen DNA wurde die RNA zunächst bei 42°C im gDNA Wipeout Puffer für 2 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zumischung des Mastermixes, bestehend aus der Quantiscript Reversen Transkriptase (bzw. RNase freies Wasser für die RT--Proben), dem Puffer und dem Primer Mix. Die reverse Transkription fand in einem iCycler (Biorad, Hercules, USA) bei 42°C für 30 Minuten statt, worauf im Anschluss eine Inaktivierung des Enzyms für 3 Minuten bei 95°C folgte. Die erhaltene cDNA konnte nun bei -20°C eingefroren aufbewahrt werden.

Tabelle 9: Primer für qualitative und qunatitative PCR

Gen	Primersequenzen 5' → 3'	Accession	Länge
β-2-Microglobulin	fwd: CCAGAAGATGGAAAGCCAAA rev: AGCGTGGGACAGAAGGTAGA	NM_001009284	159 bp
Osteocalcin	Fwd: CAGCGAGGTGGTGAAGAGAC Rev: GCTCATCACAGTCAGGGTTG	DQ418490	122bp
Osteopontin	Fwd: GGCCAAGGAGGAAAGCAAGC Rev: AATGCGGATTTTCAGGCGCT	NM_001009224	139bp

2.7.3. Qualitative PCR und Gelelektrophorese

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient der Amplifikation eines bestimmten DNA-Stranges in vitro. Der Begriff „Kettenreaktion“ wird verwendet, da nach jedem Zyklus das Endprodukt als Spaltprodukt eines neuen weiteren Zyklus dient. Im vorliegenden Projekt diente die PCR dem indirekten Nachweis der Aktivität der Osteoblasten durch dessen Proteine Osteopontin und Osteocalcin. Elementar hierfür ist das Enzym DNA-Polymerase. Um die Reinheit der cDNA zu überprüfen, wurde eine qualitative PCR sowohl für die RT+ als auch die RT- cDNA durchgeführt.

Dazu wurde 1µl der cDNA mit 2,5µl PCR Puffer II (10x) (aus Amplitaq Gold Kit, ThermoFisher Scientific, Pinneberg, Deutschland, Nr. N8080243), 2µl MgCl₂ (25mM) (aus Amplitaq Gold Kit), 0,625µl dNTPs (10mM) (Promega, Wisconsin, USA, Nr. U1515), 0,125µl Amplitaq Gold DNA Polymerase (5 u/µl) (aus Amplitaq Gold Kit), 0,625 µl Primer fwd+rev (20mM) (Tabelle 9) auf 25 µl Aqua inf. aufgefüllt. Im Biorad iCycler folgte die PCR mit folgenden Parametern: Initiale Denaturierung bei 95°C für 12 Minuten, 40 Zyklen aus Denaturierung (25 Sekunden bei 95°C), Annealing (25 Sekunden bei 58°C) und Elongation (25 Sekunden bei 72°C), daran anschließend die finale Elongation für 7 Minuten bei 72°C. Für die Gelelektrophorese der PCR-Produkte wurde ein 2% Agarose-Gel (Agarose [Roth, Karlsruhe, Deutschland, Nr. 2267.2] in Tris-Azetat-EDTA [40mM Tris Base, (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland T1503; 1mM EDTA-Na₂, Sigma, E7889; 40mM Essigsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.00063.1011]) gegossen. Von den PCR-Produkten wurden jeweils 25µl mit 2µl DNA Gel Loading Buffer 10x (5 Prime, Waltham, USA, Nr. 2500070) gemischt und 8µl der Mischung in das Gel pipettiert. Neben RT+ und RT- Proben liefen eine Wasserkontrolle und ein Bandenmarker (100bp DNA Ladder, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland, Nr. N3231S; 4µl in 12µl Gel Loading Buffer + 104µl Aqua bidest) mit. Nach einer Laufzeit von 60 Minuten in einer Gelelektrophoreseapparatur bei 110V (Biometra Power Pack P25, Göttingen, Deutschland) wurden die Gele für 20 Minuten mit Sybr® Green (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Nr. S9430) gefärbt und anschließend in einer UV-Kammer (Biometra UVSolo, Göttingen, Deutschland) mit UV-Tisch (Vilber Lourmat ECX-20.M, St. Louis, USA) fotografiert und ausgedruckt (Mitsubishi P93, Wörthsee, Deutschland).

2.7.4. Rt-PCR (Real-time-PCR)

Osteopontin ist ein Gen, welches aus sieben Exonen besteht, eine Länge von fünf Kilobasen aufzeigt und auf dem langen Arm des vierten Chromosoms anzufinden ist

(4q13). Ähnlich ist es bei Osteocalcin: dieses besteht aus sechs Exonen und sechs Kilobasen. Sein Locus ist jedoch auf Chromosom elf.

Bei der rt-PCR (*real time* = Echtzeit) wurde mit Beginn der DNA-Bindung ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) beigemischt, sodass sich dieser in die DNA einlagern konnte. Durch die Bindung an die DNA kommt es zu einem Fluoreszieren des SYBR-Greens. Hierdurch war bei jedem Zyklus eine Messung des Farbstoffgehaltes möglich und erlaubte eine Schlussfolgerung auf die neugebildete Menge DNA (Software: BIO-RAD iQ5, Version 2.0). Indem genug Kopien der genetischen Information vorlagen, konnte ein Schwellenwert erreicht und als Kurve dargestellt werden. Diese erlaubt eine quantitative Evaluation und wird dann als quantitative PCR bezeichnet. Als Nullpunkt in diesem Zusammenhang kam ein house-keeping-gene (beta-2-Mikroglobulin) zum Zuge, das als Verlaufsparemeter diente, um die richtige Durchführung der PCR zu bestätigen. Es fungiert als Protein, dessen Amplifikationsrate der Standard ist, dem gegenüber die zu testenden Proteine (Osteopontin respektive Osteocalcin) hoch- oder herunterreguliert werden. Der Mastermix für die PCR-Prozedur bestand aus 1 µl der zu testenden cDNA, 0,5 µl Primer (20 µM Fwd und Rev, Tabelle 9), 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix (Nr. 1708882, BIO-RAD, München, Deutschland) und 11 µl Wasser (RNase-frei). Die PCR-Bedingungen lauteten: 3 Minuten DNA-Denaturierung bei 95°C, 40 Zyklen Amplifikation (Denaturierung für 25 Sekunden bei 95°C, Annealing für 25 Sekunden bei 58°C und Elongation für 25 Sekunden bei 72°C) sowie eine Schmelzanalyse in 0,5°-Schritten für jeweils 10 Sekunden von 65°C bis 95°C.

2.8. Biomechanik

Um den Grad der Osteointegration und damit die Steifigkeit des Testmaterials quantitativ zu bestimmen, wurden an der Universität Siegen biomechanische Messungen (*push-out*) durchgeführt (Abbildung 20 a-c). Die Ergebnisse sind nicht Teil dieser Arbeit sondern finden in einer anderen Arbeit kritische Betrachtung. Hierzu übte man mittels eines MTS 810 Servo Hydraulic Testing Systems (Abbildung 20a) mit einer Testnadel (Abbildung 20 b, c) Druck aus, bis sich das Implantat aus dem Knochen löste (Abbildung 21). Die Kraft die hierfür vonnöten war, wurde in Newton gemessen (Extensometer) und mit der Kontrollgruppe (unfunktionalisierte Implantate) verglichen. Von Interesse war die Belastungsfähigkeit der Verankerung des Testobjektes im Lagerknochen. Diese wurde durch das sogenannte *push-out*-Verfahren getestet. Dabei ist die Lastenübertragung der Kraft von Knochen auf das Implantat entscheidend und lässt Rückschlüsse auf die Durchbauung und Integration in den Empfänger Knochen zu (Abbildung 22). Die Kraft

wurde so lange auf das Interface ausgeübt, bis es zu einem „Herausbrechen“ des Kalzium-Titanat-Implantates führte (Abbildung 21). Die adäquate Übertragung der Last hängt von der Geometrie, Oberflächenbeschaffenheit, der Beschichtung mit bioaktiven Stoffen und dem Material des Implantates ab (KAHNT et al. 2010).

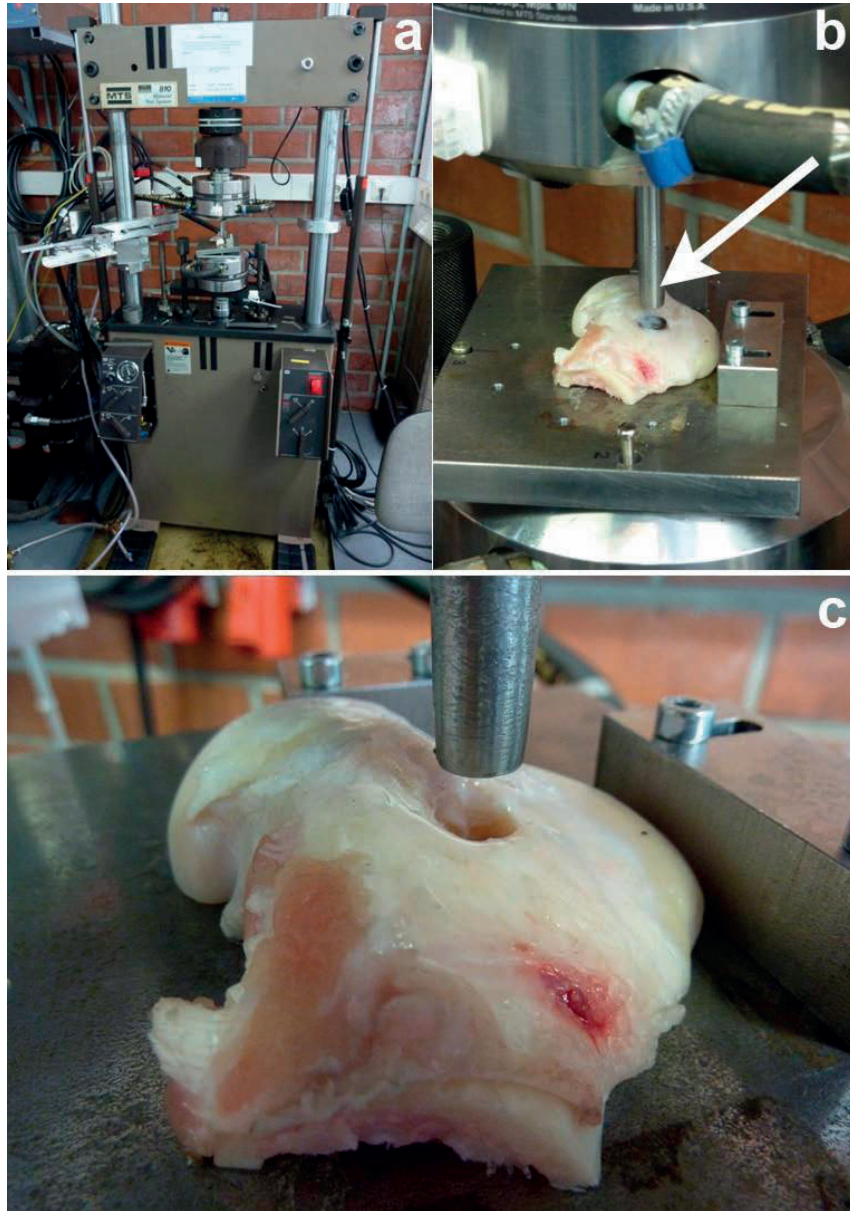


Abbildung 20: Biomechanik: push-out

a Schaffemur auf dem Probenteller der MTS 810 Hydraulik-Maschine

b Knochenscheibe mit Implantat vor der Lastenübertragung durch Testnadel (Pfeil)

c Kondyle nach der Testdurchführung mit leerem Defekt nachdem das Implantat extrahiert wurde



Abbildung 21: Biomechanik: push-out

Das Implantat wurde durch den Bolzen aus der Femurkondyle herausgedrückt



Abbildung 22: Biomechanik: push-out

Nach einer Standzeit von 6 Monaten wurde das Testobjekt (funktionalisiert) aus dem Lagerknochen mittels push-out-Test entfernt.

3. Ergebnisse

3.1. Makroskopische Evaluation

Klinische Entzündungszeichen wie Rubor, Calor oder Tumor traten postoperativ bei keinem der Schafe auf, ebenso keine Nahtinsuffizienz. Am 13. postoperativen Tag konnte das kutane Nahtmaterial komplikationslos entfernt werden und die jeweiligen Implantationsstellen stellten sich nach der Euthanasie als reizlose Narben dar. Das Operationsgebiet zeigte nach einer gesamten Standzeit von sechs Monaten nur teilweise knöcherne Umbauten innerhalb des Defektes. Augenscheinlich konnte hierbei kein Hinweis auf eine abgelaufene Infektion gefunden werden.

3.2. Mikroskopische Evaluation

Die Evaluation der histologischen Befunde erfolgte vor allem am Implantat-Knochen-*Interface* und dessen zellulärer Reaktion. Großes Interesse galt den Knochenbildnern und deren Vorläufern, den neusynthetisierten Knochenanteilen und - im Zusammenhang mit α -SMA - der Perfusion. Wichtig war zudem, ob das Implantat histologisch inert erschien, indem sich keine Abkapselung des Implantates mit Granulationsgewebe zeigte sowie keine Entzündungszellen zu detektieren waren. Hierbei war zu unterscheiden, ob die bioaktive Reaktionsschicht sich als different in Sachen Knochenneubildung bewies und wenn ja, ob dies zu einem statistisch signifikanten Ergebnis führte.

3.2.1. Osteointegration

Bei der Beurteilung der Osteointegration der Titanimplantate fällt unabhängig von der vorhandenen oder nicht vorhandenen Funktionalisierung auf, dass oftmals ein bindegewebiger Spalt das Knochenlager von der **Außenseite** des Implantates separiert (Abbildung 24b). So zeigen die Toluidinblau gefärbten Schliffe von Schaf Nr. 10 und 14 (unfunktionalisiert) sowie 15, 21 und 23 (funktionalisiert) eine nahezu vollständige Separation des Implantates vom Knochen. Schaf 6 und 16 (unfunktionalisiert), bzw. 19 (funktionalisiert) weisen zumindest stellenweise einen dichten Kontakt zwischen Knochen und Implantat auf. Lediglich Schaf Nr. 12 und 24 (Abbildung 24a, beide unfunktionalisiert) sowie 11 (Abbildung 27) und 25 (Abbildung 23), zeigen eine nahezu vollständige Integration in das Knochenlager. Abzugrenzen hiervon sind schmale artifiziell entstandene Spalten, die aufgrund der unterschiedlichen Härte zwischen Metall und Knochen bzw. Weichgewebe beim Sägen und Schleifen auftreten können

(Abbildung 25), aber nicht müssen (Abbildung 26 und 27), und die grundsätzlich "leer" sind und kein Granulations- oder Bindegewebe enthalten.

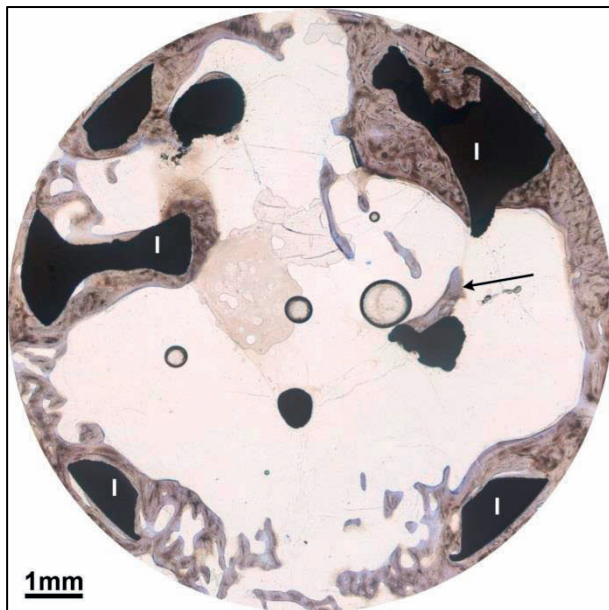


Abbildung 23: Histologie: Toluidinblau

Übersichtsbild Schaf 25 unfunktionalisiertes Implantat: Der Knochenschliff zeigt eine gute knöcherne Integration des Implantates (I). Neu gebildeter Knochen zieht durch die Öffnungen am Implantat entlang bis in Innere des Defektes (Pfeil).

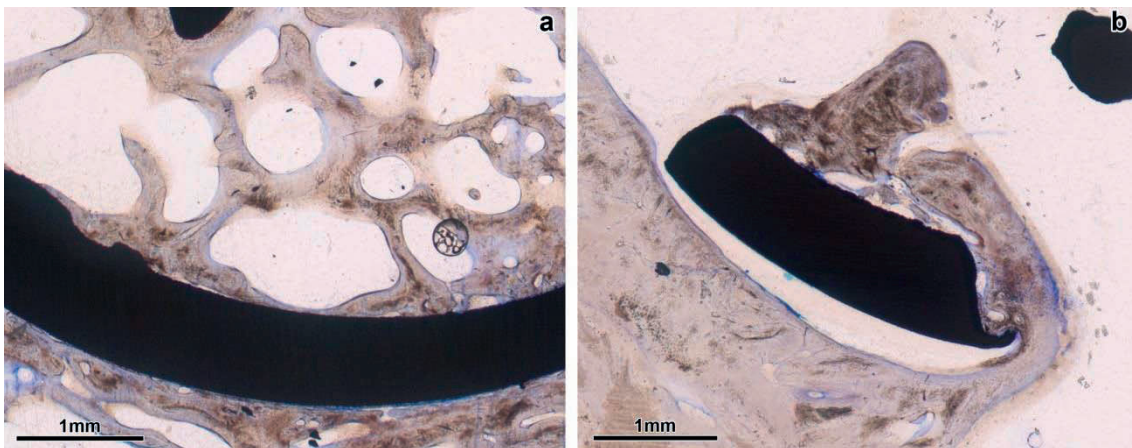


Abbildung 24: Histologie: Toluidinblau

a Schaf 24 unfunktionalisiertes Implantat: suffizientes Einwachsen

b Schaf 21 funktionalisiertes Implantat: Im Vergleich ungenügende Adaptation an der Außenseite des Surrogates.

Je nach Anschnittebene des Implantates sind unterschiedlich viele Poren im Implantat vorhanden. An diesen lässt sich gut erkennen, dass der Knochen durch die Poren hindurch am Titan entlang an die Innenseite des Hohlkörpers wächst (Abbildung 23) und es dort zu einer innigen Verbindung aus Metall und Geflechtknochen kommt (Abbildung 24a und 28). So zeigen Schaf Nr.16 und 24 (unfunktionalisiert) und Schaf Nr. 25 (funktionalisiert) eine fast vollständige knöcherne Abdeckung der **inneren Oberfläche** des Hohlkörpers, während Schaf Nr.12 (unfunktionalisiert), bzw. 11, 19 und 21 (funktionalisiert) eine teilweise, bzw. Schaf Nr. 6, 10 und 14 (unfunktionalisiert) und 23 (funktionalisiert), nahezu keine Knochenneubildung zeigen.



Abbildung 25: Histologie: Toluidinblau

Schaf 14 S3 unfunktionalisiertes Implantat:Das Implantat (I) weist vor allem an der Innenseite eine enge Verbindung zum neu gebildeten Knochen auf, während es auf der Außenseite zu einer Spaltbildung zwischen Knochen und Implantat kommt (Pfeile). K: Lagerknochen.

Das Innere des Implantatkörpers weist bei allen Implantaten große Hohlräume auf, weil die ursprünglich anvisierte Porendichte von 30ppi gießtechnisch nicht erreicht werden konnte. Lediglich wenige grobe innenliegende Titanstrukturen sind daher zu beobachten, die dann auch entsprechend spärlich von einwachsendem Knochen erreicht werden. Stattdessen findet sich in Proben vereinzelt Fettmark und gelegentlich schmale Knochenschuppen an "frei"-liegenden inneren Implantatanteilen (Abbildung 23). Vereinzelt lässt sich ein durch zahlreiche Knochenbälkchen ausgefülltes Implantatlumen beobachten (Abbildung 24a).

3.2.2. Knochenaufbau

Hinsichtlich des Knochenaufbaus konnte kein erhöhter Umsatz bzw. keine erhöhte Aktivität der Osteoblasten im Vergleich der funktionalisierten Implantate und deren Kontrollgruppe festgestellt werden (Tabelle 10).

Nach Markierung und Ausmessen der Knochenfläche und biologisches Material im AOI (Implantatdurchmesser plus 100px) ergeben sich folgende Messwerte für die einzelnen Präparate:

Tabelle 10 Messwerte Toluidinblau

Biologisches Material (BM) Menge an neugebildeter Knochen (Knochen) in mm², Testgruppe Funktionalisiert (1) und Unfunktionalisiert (0), Area of Interest (AOI) in mm² sowie die Fläche des Implantates in mm²

Tier-Nr.	Testgruppe	AOI (mm ²)	BM (mm ²)	Knochen	Implantat
6	0	108,279234	9,931329	34,776143	24,392586
10	0	90,11272	27,747339	16,170029	25,458276
11	1	102,248813	31,303207	22,932362	28,36818
12	0	98,08045	17,359384	15,711337	11,003599
14	0	102,47202	34,869638	34,869638	10,81716
15	1	96,542041	18,590021	40,741874	24,370912
16	0	102,041266	21,708421	18,455927	30,323432
19	1	104,765248	36,466206	14,610562	19,060192
21	1	103,964565	26,24085	29,854378	12,71232
23	1	99,871504	9,700525	17,882732	36,087464
24	0	98,364248	25,002216	37,725498	18,876152
25	1	96,948621	11,977243	31,973195	23,928696

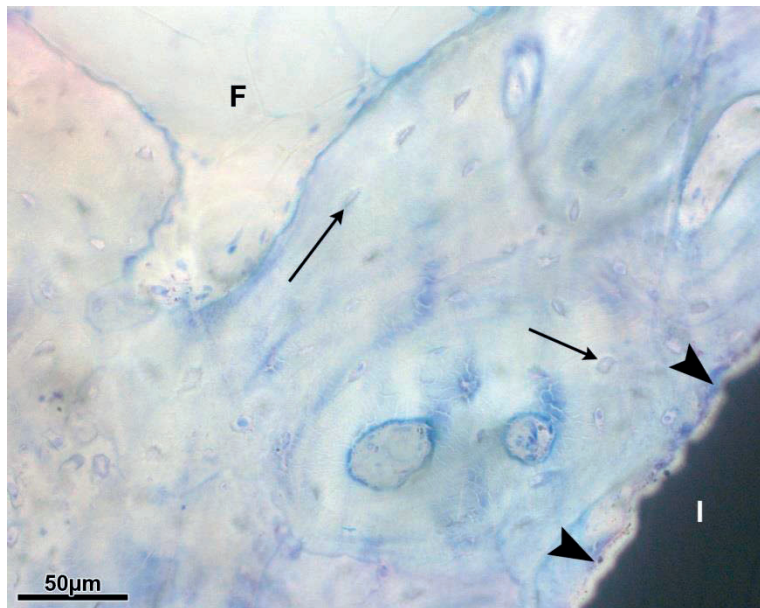


Abbildung 26: Histologie: Toluidinblau

Schaf 24 S3 unfunktionalisiertes Implantat: Der Knochen liegt dem Implantat (I) an, zeigt aber einen präparationsbedingten artifiziellen Spalt (Pfeilkopf). Pfeil: Osteozyten in ihren Lakunen

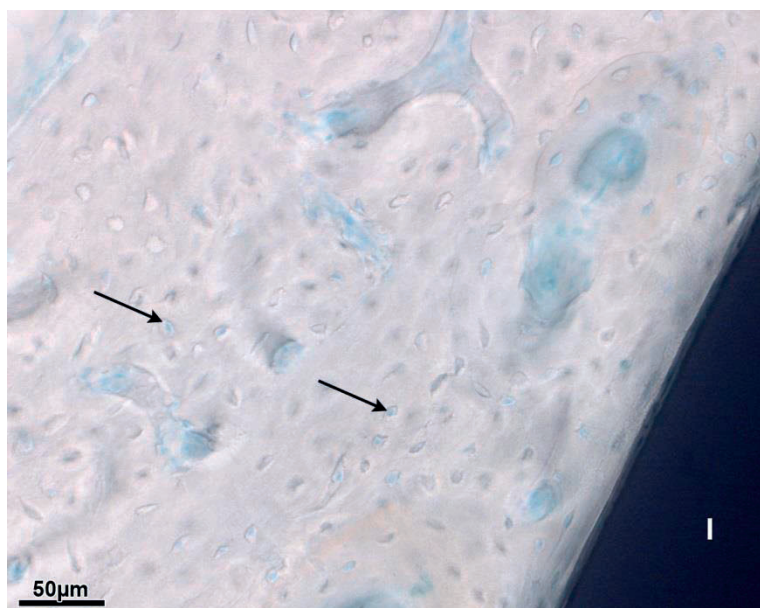


Abbildung 27: Histologie: Toluidinblau

Schaf 11 S4 I funktionalisiertes Implantat: Gut erkennbar sind hier die in ihren Lakunen liegenden inaktiven Osteozyten (Pfeil). Es zeigt sich eine innige Verbindung zwischen Geflechtknochen und Implantat (I) und zeigt sogenanntes „bone bonding“.

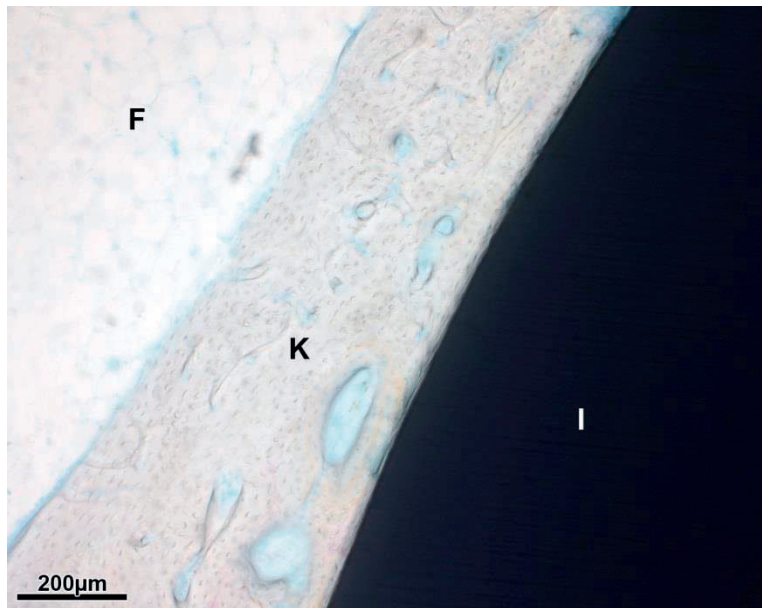


Abbildung 28:Histologie: Toluidinblau

Schaf 11 S4 I funktionalisiertes Implantat: Neu gebildeter Knochen (K) liegt dem Implantat (I) direkt auf (=bone bonding) F= Fettmark

3.2.3. Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase dient als Indikator für eine Osteoblasten-vermittelte Aktivität, da diese mittels eines Lipidankers an dessen Plasmamembran verankert und für die Mineralisation des Osteoides verantwortlich ist. Ebenfalls kann die alkalische Phosphatase bei Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen gefunden werden. Sie ist somit nicht spezifisch für den Osteoblasten. Bei der vorliegenden Arbeit diente sie als indirekter Nachweis der Knochenbildner (Abbildung 29) und ferner dazu, deren Umsatz zu quantifizieren. Der Knochenbildner schnürt über seine Ausläufer kleine Vesikel ab, in denen sich kleine Hydroxylapatit-Ionen bilden. Nach Platzen der Bläschen lagert sich dieses neue Knochenmaterial an die Fibrillen des Kollagens an. Die alkalische Phosphatase wird nur nachgewiesen, wenn neuer Knochen gebildet oder umgebildet wird. So konnte durch diese enzymhistochemische Färbung nicht nur der Osteoblast (Abbildung 34) selbst, sondern auch dessen Aktivität nachgewiesen werden. Violett angefärbt ist das Enzym alkalische Phosphatase und rosafarben die Kerngegenfärbung. Auffällig bei allen Präparaten war, dass eine hohe Aktivität der Osteoblasten um das Implantat (Abbildung 29) nachgewiesen werden konnte und dadurch ein besonders hoher Knochenumsatz vorliegt. Allerdings konnte keine erhöhte Enzymaktivität bei den Implantaten mit bioaktiver Oberflächenbeschichtung festgestellt werden.

Bei den verschiedenen Individuen zeigen sich Variationen in der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die unabhängig vom Vorhandensein einer Funktionalisierung ist. So zeigen Schaf Nr. 6 (Abbildung 33), 10, 12, und 24 (unfunktionalisiert) sowie Schaf Nr. 15, 19, und 25 (funktionalisiert) eine moderate Enzymaktivität, die sich auf einige Knochenoberflächen beschränkt, während bei Schaf Nr. 14 (Abbildung 30) und 16 (unfunktionalisiert), bzw. 11 (Abbildung 29, 31, 32 und 34), 21 und 23 (funktionalisiert) eine deutliche Enzymreaktion an sämtlichen Oberflächen im Defektbereich zu beobachten ist. Durch den Gießvorgang entstandene Kavitäten im Implantatgefüge können knöchern besiedelt werden, so lange sie von außen zugänglich sind (Abbildung 34). Wie bereits dargestellt, zeigt sich die Geometrie der Implantate direkt verantwortlich für die Fähigkeit des Knochens, den Implantathohlraum zu besiedeln. Die Poren zeigen sich verantwortlich für das Einwachsen des Knochens (Abbildung 36a), während bei deren Fehlen (Abbildung 36b) es zumindest im beobachteten Zeitraum nicht zu einer Osteointegration innerer Implantatstrukturen kommt. Jedoch findet sich keine Korrelation zwischen der Besiedelungstiefe im Implantat und der Aktivität der alkalischen Phosphatase.

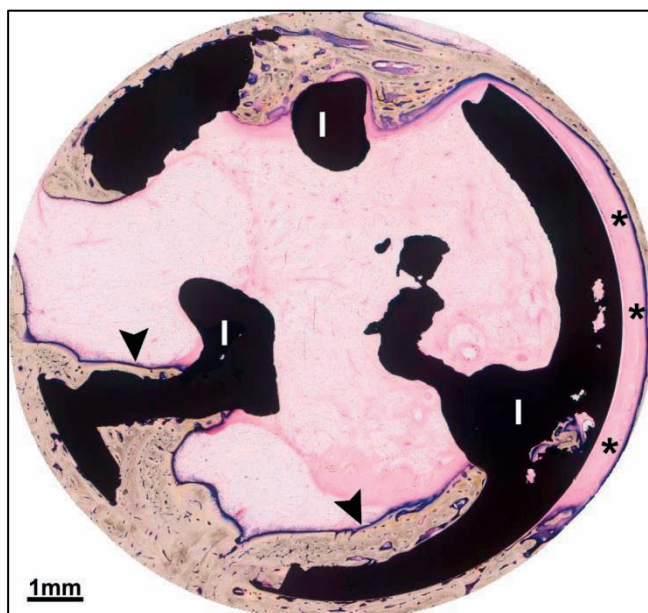


Abbildung 29: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase

Übersichtsbild Schaf 11 funktionalisiertes Implantat (I) vor Messung der Enzymaktivität (Blau). Während durch die Implantat-Poren einwachsender Knochen vornehmlich die Innenseite des Implantates bedeckt, trennt auf der Außenseite ein breiter bindegewebiger Spalt den Knochen vom Implantat (Stern). Abgesehen davon zeigen sämtliche Knochenoberflächen eine starke Enzymaktivität (Pfeilkopf).

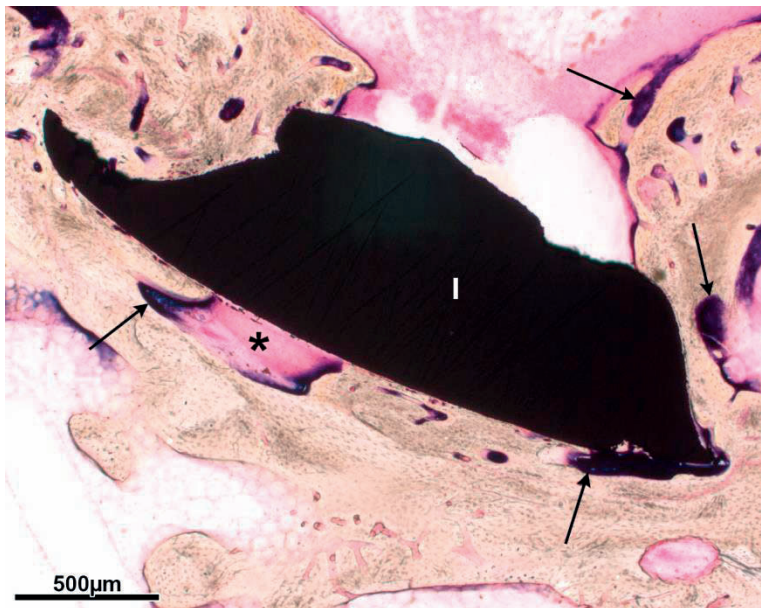


Abbildung 30: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase

Schaf 14 S4 unfunktionalisiertes Implantat: Der Knochen zeigt sowohl implantatnah als auch im Defektbereich eine hohe Enzymaktivität (Pfeil). Ein bindegewebig gefüllter Spalt (Stern) verbleibt an der Außenseite des Implantates (I).



Abbildung 31: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase

Schaf 11 S2 funktionalisiertes Implantat: Der Lagerknochen weist eine hohe enzymatische Aktivität auf (Pfeil). Trotzdem verbleibt ein breiter, bindegewebig gefüllter Spalt (Stern) zwischen Knochen und Außenseite des Implantates (I). Das Innere des Defektes ist mit Fettmark (F) ausgefüllt.

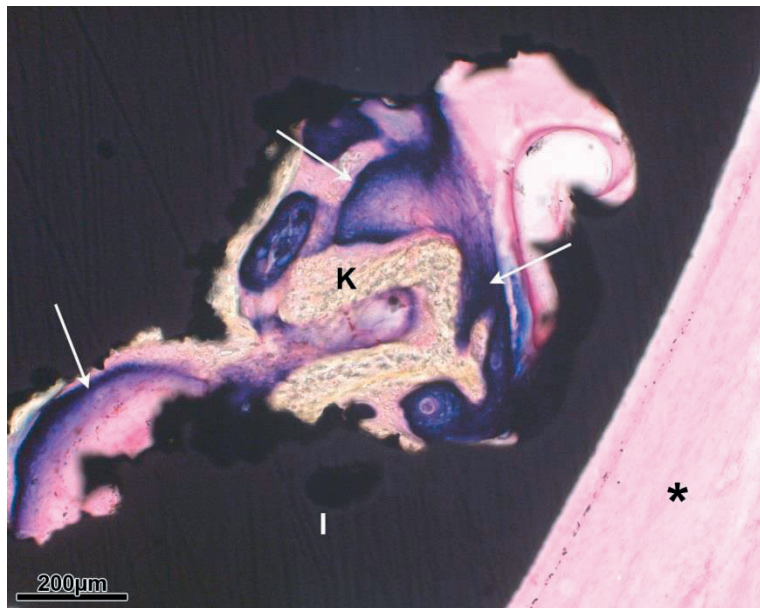


Abbildung 32: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase

Schaf 11 S2: funktionalisiertes Implantat: Eine Kavität im Implantat (I) ist mit neu gebildetem Knochen (K) gefüllt, der eine deutliche Enzymaktivität (Pfeil) aufweist. Ein bindegewebiger Saum (Stern) separiert an der Außenseite des Implantates den Knochen vom Fremdmaterial.

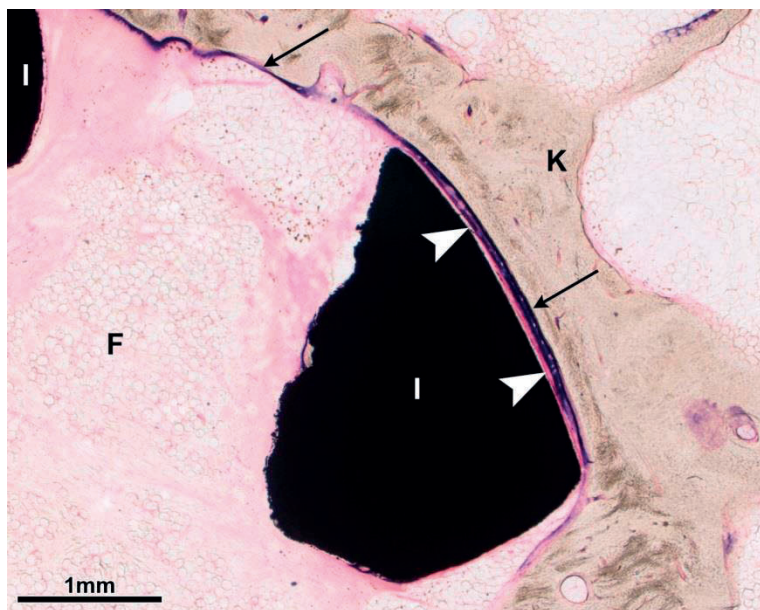


Abbildung 33: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase

Schaf 6 S2 unfunktionalisiertes Implantat: Der Lagerknochen (K) weist eine deutliche Enzymaktivität auf (Pfeil). Zwischen Implantat (I) und Lager verbleibt ein schmaler Bindegewebsstreifen (Pfeilkopf).
F = Fettmark

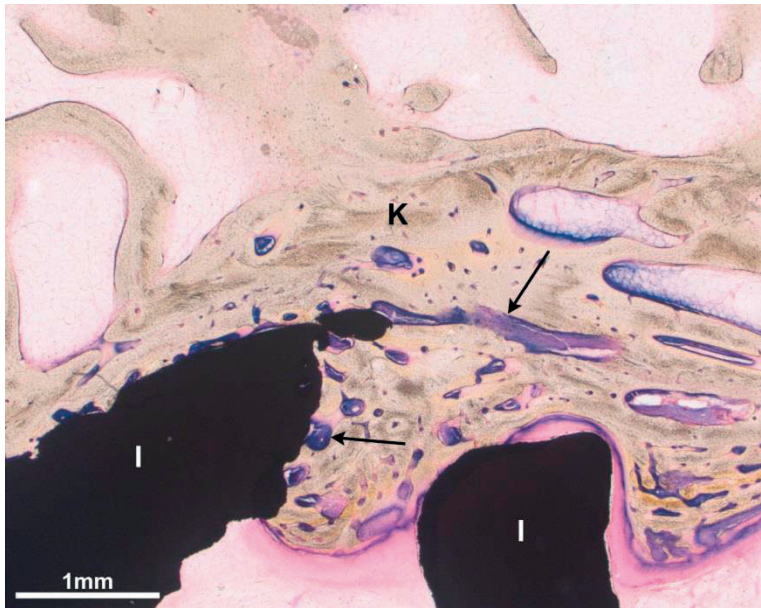


Abbildung 34: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase

Schaf 11 S2 funktionalisiertes Implantat: enzymhistochemischer Nachweis der alkalischen Phosphatase (Pfeil) innerhalb des Knochens (K) anliegend an das Implantat (I). Der Knochen wächst durch die Poren in das Innere des Implantates (I), umgibt das Material jedoch nur teilweise. Die deutliche Farbreaktion zeigt, dass das Wachstum des Knochens auch nach 6-monatiger Standzeit noch nicht abgeschlossen ist.

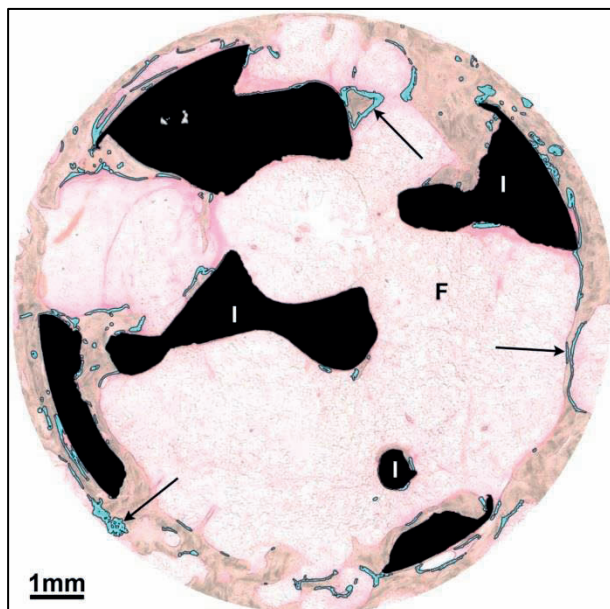
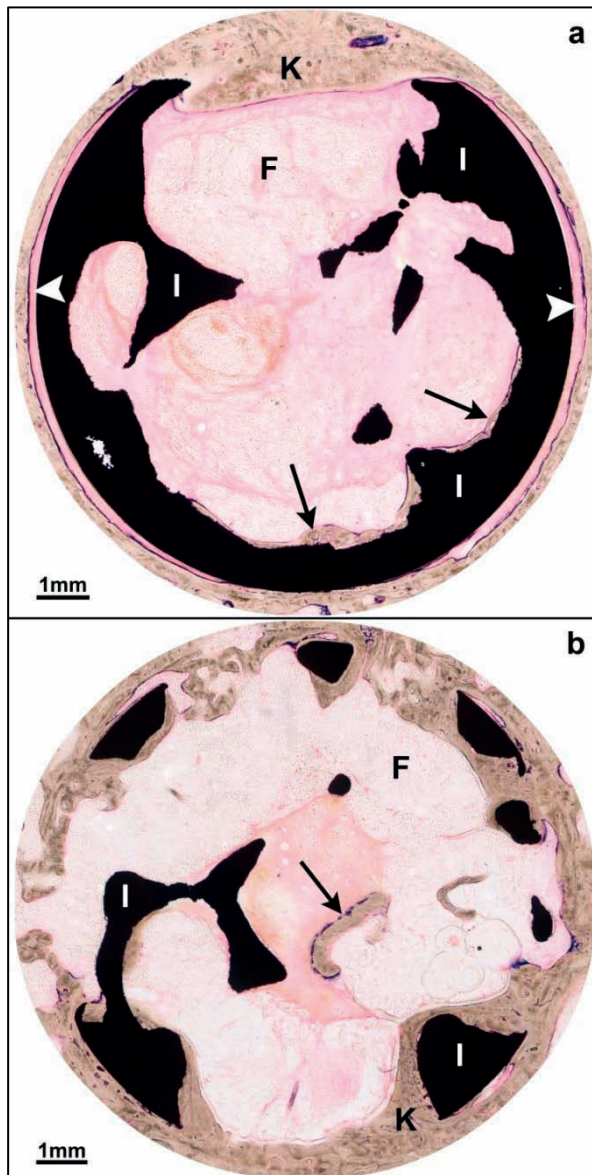


Abbildung 35: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase

Übersichtsbild von Schaf 24 S2 funktionalisiertes Implantat: Messung und Markierung der alkalischen Phosphatase in blau (Pfeil), F=Fettmark I=Implantat



a Schaf 16 unfunctionalisiertes Implantat: Nur ein kleiner Teil der inneren Oberfläche des Implantates (I) wurde durch Knochen besiedelt (Pfeil). Durch die Öffnung am dorsalen Rand des Hohlkörpers beginnt der Knochen (K) langsam in das vollständig durch Fettmark (F) gefüllte Innere vorzudringen. An der Außenseite des Implantates separiert eine Bindegewebszone (Pfeilkopf) den enzymatisch aktiven Knochen vom Implantat

b Schaf 25 S2 funktionalisiertes Implantat: Bedingt durch die zahlreichen Öffnungen ist Geflechtkochen (K) am Implantat (I) entlang gewachsen und schließt dieses in der Schliffebene fast vollständig ein. Im Zentrum des Defektes befindet sich neben Fettmark (F) ein Knochenareal mit deutlicher Enzymaktivität (Pfeil).

Abbildung 36: Enzymhistochemie: Alkalische Phosphatase

Abhängigkeit der Knochenneubildung von der Implantat-Geometrie

Zur quantitativen und qualitativen Evaluation der indirekten Messung der Aktivität des Osteoblasten (Enzymaktivität) am Interface wurde manuell mittels Photoshop (Adobe Photoshop CS5 WIN 2010) die alkalische Phosphatase markiert (Abbildung 35) und gemessen.

Bei der Enzymaktivitäts-Auswertung der Osteoblasten durch die alkalische Phosphatase der gemessenen Knochenmenge nach einer Standzeit von 6 Monaten, konnte sowohl keine erhöhte Enzymaktivität (Tabelle 11) als auch keine erhöhte Knochenneubildungsrate (Tabelle 12) nachgewiesen werden.

Tabelle 11 Messwerte alkalische Phosphatase

Ergebnisse der Histomorphometrischen Auswertung der alkalischen Phosphatase (AP) mit AOI (Area of Interest), BM (biologisches Material, der Implantatgröße in mm²

Tier-Nr.	Testgruppe	AOI	BM	Implantat	AP
6	0	109,076935	84,684349	24,392586	1,009579
10	0	105,745106	80,28683	25,458276	0,972795
14	0	101,482466	90,665306	10,81716	1,769263
15	1	101,804548	77,433636	24,370912	1,496526
16	0	101,401	71,077568	30,323432	1,498709
19	1	100,553003	81,492811	19,060192	1,330812
23	1	103,523015	67,435551	36,087464	2,56085
11	1	103,67252	75,30434	28,36818	4,438917
25	1	99,293211	86,580891	12,71232	1,530029
21	1	101,48913	75,261741	26,227389	1,214194
24	0	96,797218	77,921066	18,876152	1,268805
12	0	92,151087	90,936493	11,003599	1,214594

Tabelle 12 Messwerte Knochenneubildungsrate

Ergebnisse der Histomorphometrischen Auswertung des neugebildeten Knochens in mm²

Tier-Nr.	Testgruppe	Knochen
6	0	13,140225
10	0	16,170029
14	0	27,871554
15	1	9,526631
16	0	17,438917
19	1	24,408946
23	1	10,770629
11	1	20,863807
25	1	28,061258
21	1	9,226972
24	0	18,184956
12	0	7,805548

3.2.4. Immunhistochemie: Anti- α -SMA

Da Myofibroblasten einen hohen Gehalt an α -SMA (alpha-smooth-muscle-Actin) besitzen, können durch einen monoklonalen Antikörper (anti-alpha-smooth-muscle-Antikörper; ASMA) glatte Muskelzellen, wie sie in Blutgefäßen (dann als Perizyten bezeichnet) des Gefäßendothels zu finden sind, markiert und anschließend immunhistochemisch nachgewiesen werden. Längs und quer angeschnittene, markierte Blutgefäße sind vermehrt im Granulationsgewebe nahe der Bohrkante anzutreffen (Abbildung 37).

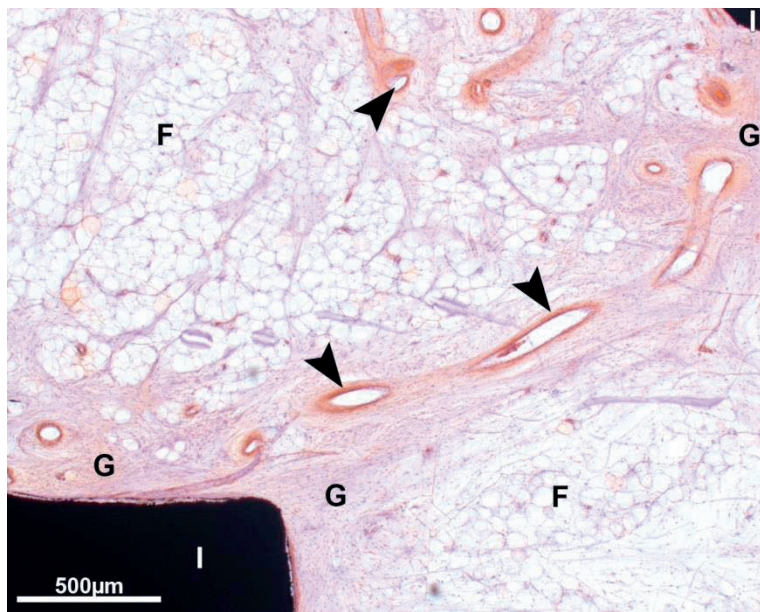


Abbildung 37: Histologie: Immunhistochemie Anti- α -SMA -AK

Schaf 12 S5 unfunktionalisiertes Implantat: Vergrößerung, Defektbereich nahe der Bohrkante, Technovit 9100neu, Dünnschliff, Gegenfärbung: Hämatoxylin. Zahlreiche großlumige und wandstarke Blutgefäße (Pfeilkopf) lassen sich im Defektbereich eingebettet in Granulationsgewebe (G) nachweisen. F = Fettmark I = Implantat

Nach einer Standzeit von sechs Monaten zeigt sich, dass eine mäßige Gefäßeinsprossung mit α -SMA-positiven-Gefäßen innerhalb des Fettmarkes (Abbildung 38) auftrat. Hingegen lässt sich innerhalb von Granulationsgewebe eine hohe Proliferation von Gefäßen (Abbildung 37) detektieren. Dies konnte in beiden Testgruppen, unabhängig von der Funktionalisierung mit Kalzium-Titanat, beobachtet werden.

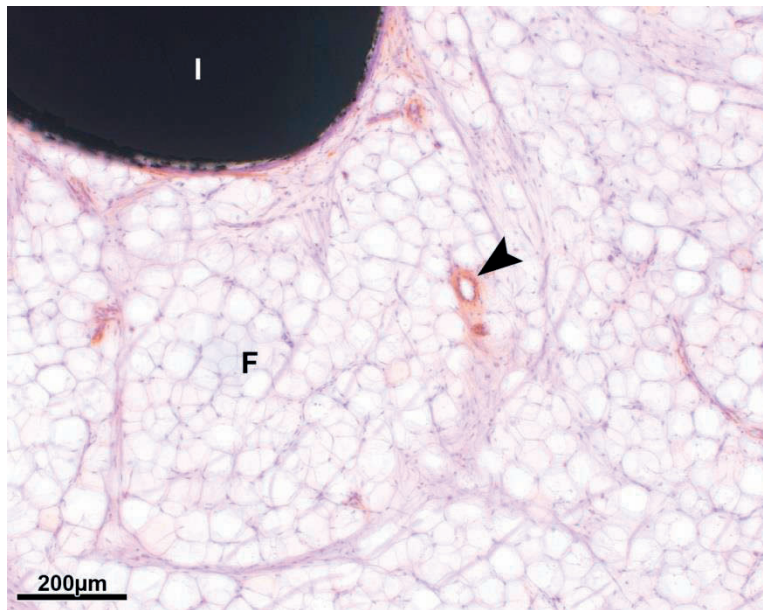


Abbildung 38: Histologie: Immunhistochemie Anti- α -SMA -AK

Schaf 12 S5 unfunktionalisiertes Implantat: Vergrößerung des Defektbereichs nahe der Bohrkante, Technovit 9100neu, Dünnschliff. Hämatoxylin-Gegenfärbung. Im Gegensatz zum Granulationsgewebe zeigen sich nur kleinlumige Gefäße (Pfeilkopf) im Fettmark (F). . I = Implantat

Es lassen sich jedoch keine Unterschiede in der vaskulären Genese zwischen den Implantatgruppen beobachten.

3.2.5. Fluoreszenz: Alizarin

Wie unter Kapitel 2.3.7. erwähnt, wurden den Versuchstieren prä mortal drei verschiedene Farbstoffe verabreicht. So wurden den Tieren Tetracyclin, Alizarin und Calcein zu verschiedenen postoperativen Zeitpunkten appliziert und lassen so eine zeitliche Zuordnung der Knochenneubildung zu. Diese Neubildungsphasen sind bei ungefärbter, fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung in gelb, rot und grün voneinander abgrenzbar (Abbildung 39 - 41). Die gelben Banden zeigen ein Knochenwachstum ab dem 28. Tag (Kapitel 2.3.7.) auf und werden durch die postoperativ erfolgte Tetracyclin-Gabe hervorgerufen. Die rot angefärbten Strukturen reflektieren die Entstehung neuen ossären Gewebes nach der Applikation von Alizarin ab dem 105. postoperativen Tag (Abbildung 40). Zuletzt wurde am 176. und am 183. Tag post operationem Calcein verabreicht, welches durch die grüne Fluoreszenz widergespiegelt wird. Die Tetracyclin- und Calcein-Fluoreszenz sind nicht Thema der vorliegenden Arbeit und werden daher nur kurz vorgestellt.

In allen Präparaten lassen sich kräftige grüne und rote Banden, allerdings auch gelbe Fluoreszenzen antreffen, wenngleich die gelben Fluorchrome teilweise nur schwer von den grünen Fluoreszenzen zu unterscheiden sind (Abbildung 39). Bei der Auswertung zeigte sich, dass die zeitliche Abfolge der Synthese des Knochens nach einer Standzeit von sechs Monaten durch die gelben und roten Fluoreszenzen gut nachvollziehbar war, die grünen Banden hingegen ungeordnet zwischen Verbindungs- und Bruchlamellen verteilt wirkten. Die Berechnung der Alizarin-markierten Knochenneubildung erfolgte durch Photoshop (Adobe Photoshop CS5) (Kapitel 2.5.3.). Hierzu wurden alle mittels Alizarin angefärbten Knochenstrukturen in sämtlichen Präparaten rot markiert (Abbildung 53), addiert und als Prozentanteil des AOI nach Subtraktion der Implantatfläche definiert, sodass in der Endsumme die Knochenneubildung ab dem 105. Tag resultierte und vergleichend statistisch ausgewertet werden konnte (Kapitel 3.3.4.).

Im Gegensatz zu den gefärbten Knochenschliffen (Toluidinblau, Alkalische Phosphatase und α -smooth muscle actin), bei denen jeweils nur eine beschränkte Anzahl zur Auswertung zur Verfügung standen, konnte die Fluoreszenz (da vor den Färbungen dokumentiert) in sämtlichen erstellten Knochenschliffen gemessen werden. Somit ergibt sich eine bessere statistische Relevanz (funktionalisiert: n=41, unfunktionalisiert: n=43). Aufgrund der Tatsache, dass sämtliche Fluorchrome eine deutliche Farbreaktion hervorgerufen haben und weder das Weichgewebe noch das Implantat nennenswerte Eigenfluoreszenzen aufweisen, zeigen die Übersichten des Defektbereiches (Abbildung 39-41) einen deutlichen Kontrast zwischen Knochengewebe (farbig) und dem Rest (dunkel, bzw. schwarz, wobei Implantatanteile zur leichteren Unterscheidung durch den Betrachter weiß umrandet wurden). Der durch Alizarin markierte, nach etwa 3 Monaten entstandene Knochen wächst zumeist in schmalen Banden parallel zum Defekt appositionell (Abbildung 46), gelegentlich aber auch interstitiell, verwoben mit älteren und jüngeren Knochenabschnitten (Abbildung 45). Die Präparate im Einzelnen (U = unfunktionalisiert; F = funktionalisiert):

Schaf Nr. 6U (7 Knochenschliffe), Schaf Nr. 10U (Abbildung 47; 8 Knochenschliffe), Schaf Nr. 14U (Abbildung 40, 41; 9 Knochenschliffe) und Schaf Nr. 15F (5 Knochenschliffe) zeigen eine deutliche Spaltbildung zwischen Knochenlager und Implantataußenseite. Es findet ein moderates Einwachsen des Knochens durch die Poren statt, wobei innenliegende Implantatanschnitte nicht osteointegriert werden. Lediglich die tiefer im Knochen gelegenen Scheiben weisen bei allen Tieren zahlreiche Knochentrabekel im Defektbereich auf: hier ist das Ende des Implantates erreicht und der Knochen wächst von lateral durch den "Implantatboden". Bei Schaf Nr. 12U (Abbildung 39, 42; 8 Knochenschliffe), Schaf Nr. 23F (9 Knochenschliffe) und Nr. 24U (6

Knochenschliffe) findet sich eine gute, wenn auch nicht vollständige Adaptation des Knochens an das Implantatäußere. Der Knochen von Nr. 12 und 23 zeigt eine moderate, von Nr. 24 eine stärkere Tendenz durch die Poren in das Innere des Implantates vorzudringen. Dies ändert sich erst in der tief gelegenen Scheibe 4, die "bodennah" bei allen Tieren zahlreiche Knochenbälkchen aufweist. Schaf Nr. 11F (Abbildung 43) und Schaf Nr. 16U zeigen in 9, Schaf Nr. 19F in 8 sowie Schaf Nr. 21F und Schaf Nr. 25F in 7 Knochenschliffen ein Implantat, das stellenweise sehr gut an das Knochenlager angrenzt (Abbildung 42), stellenweise aber Spalten (Abbildung 44 und 47) aufweist. Der Knochen wächst durch die Poren in das Defektinnere und bedeckt dabei Teile der inneren Implantatstruktur (Abbildung 42). Die "bodennahen" Abschnitte weisen keine stärkere Knochenfüllung auf. Trotz der hohen Probenzahl (n=84) konnte keine statistische Signifikanz hinsichtlich der Knochenneubildungsrate bei der Auswertung des Fluorochroms Alizarin nachgewiesen werden (Tabelle 13).

Tabelle 13 Messwerte Alizarin

Messergebnisse der histomorphometrischen Messung des Fluorochromes Alizarin mit AOI (Area of Interest), Implantatgröße, Knochenmenge (Knochen) in mm²

Tier-Nr.	Testgruppe	AOI	Implantat	Knochen	Alizarin
6	0	108,518701	24,764298	83,754403	1,063224
6	0	108,310221	33,139175	75,171046	1,187189
12	0	102,807613	21,701091	81,106522	1,594136
6	0	105,361233	33,469388	71,891845	1,175827
10	0	108,876901	27,747339	81,129562	1,251662
11	1	108,954036	17,9598	90,994236	1,059475
11	1	103,404706	30,842394	72,562312	1,069067
11	1	104,126531	29,199733	74,926798	1,223923
14	0	102,601383	9,766747	92,834636	2,112337
12	0	97,818959	12,647214	85,171745	0,807897
14	0	102,301274	9,734677	92,566597	3,259325
12	0	99,829038	28,565448	71,26359	1,005998
15	1	60,998617	5,134444	55,864173	0,578442
12	0	98,346805	15,319234	83,027571	0,449146
14	0	94,229171	28,748205	65,480966	0,788921
25	1	99,380275	13,983007	85,397268	5,867005
23	1	102,616976	24,354619	78,262357	1,555818
15	1	101,460158	25,829238	75,63092	4,116968
21	1	101,692262	19,044998	82,647264	6,764865
23	1	99,380275	13,359967	86,020308	2,761166
21	1	99,879434	39,339858	60,539576	5,002949
21	1	98,82349	25,11262	73,71087	0,994902
21	1	101,692262	19,044998	82,647264	6,764865
19	1	102,035618	23,707155	78,328463	0,438567
16	0	102,033553	26,27087	75,762683	0,716035
16	0	101,853628	20,830637	81,022991	2,779025
16	0	102,807797	26,005048	76,802749	0,525548
19	1	105,043832	2,522549	102,521283	0,796568
23	1	102,616976	24,354619	78,262357	1,555818
23	1	99,380275	4,328596	95,051679	2,264923
24	0	99,380275	20,356085	79,02419	7,395152
24	0	99,380275	5,404765	93,97551	3,955802
19	1	104,817676	20,301724	84,515952	4,278751

25	1	99,380275	23,928696	75,451579	4,795935
24	0	99,380275	23,52883	75,851445	7,514636
25	1	99,380275	9,914786	89,465489	2,796235
24	0	99,380275	18,040533	81,339742	2,173994
23	1	104,186206	8,341574	95,844632	2,401033
21	1	99,380275	24,209313	75,170962	1,661841
19	1	104,465156	33,549038	70,916118	1,498192
16	0	102,988222	34,884748	68,103474	0,210229
16	0	104,313219	18,120267	86,192952	3,407314
16	0	104,860475	25,986122	78,874353	4,253028
15	1	98,57656	15,850312	82,726248	1,92913
14	0	99,380275	9,606197	89,774078	3,041033
14	0	101,620741	9,429138	92,191603	3,79227
14	0	102,489529	26,666356	75,823173	1,762232
12	0	100,558584	26,392553	74,166031	1,526264
12	0	101,334144	15,498192	85,835952	1,491062
15	0	102,620608	11,680317	90,940291	1,465356
11	1	99,409879	20,018309	79,39157	1,737526
11	1	99,398134	17,776393	81,621741	0,779192
10	1	103,797234	27,485115	76,312119	1,266722
10	1	100,364848	16,318101	84,046747	11,699159
6	0	106,332078	33,01586	73,316218	1,511387
6	0	106,235535	24,038617	82,196918	2,62289
19	0	98,519434	16,34314	82,176294	1,227189
19	0	109,509988	39,383524	70,126464	0,892978
21	0	104,465156	33,549038	70,916118	1,498192
16	0	103,379042	38,134344	65,244698	1,897243
16	1	104,527247	24,870637	79,65661	1,653128
16	0	99,380275	30,160483	69,219792	1,681983
15	0	98,652312	11,339625	87,312687	2,194202
14	0	99,083382	19,934094	79,149288	1,333828
14	1	103,797234	27,485115	76,312119	1,266722
14	0	99,380275	11,462741	87,917534	2,773195
12	0	99,380275	14,783274	84,597001	2,059259
12	1	99,88015	24,953319	74,926831	2,102057
15	1	99,380275	13,359967	86,020308	2,761166
11	0	100,055594	16,33691	83,718684	0,791187
11	0	100,988505	25,670537	75,317968	1,354719
11	0	101,763382	20,100558	81,662824	2,581991
10	0	102,106322	32,268088	69,838234	0,310654
10	0	106,69606	14,512103	92,183957	1,064573
10	0	97,789921	19,617276	78,172645	3,34294
10	0	102,118484	21,566131	80,552353	4,053911
6	1	100,077051	19,420308	80,656743	3,948955
6	1	102,827905	21,516302	81,311603	1,764698
19	0	99,398134	17,776393	81,621741	0,779192
19	1	102,15975	34,077918	68,081832	0,639534
14	1	106,318667	34,236685	72,081982	0,685431
25	0	110,254244	23,511404	86,74284	1,345606
23	1	110,254244	23,511404	86,74284	1,345606
12	1	105,378059	30,195319	75,18274	1,273536

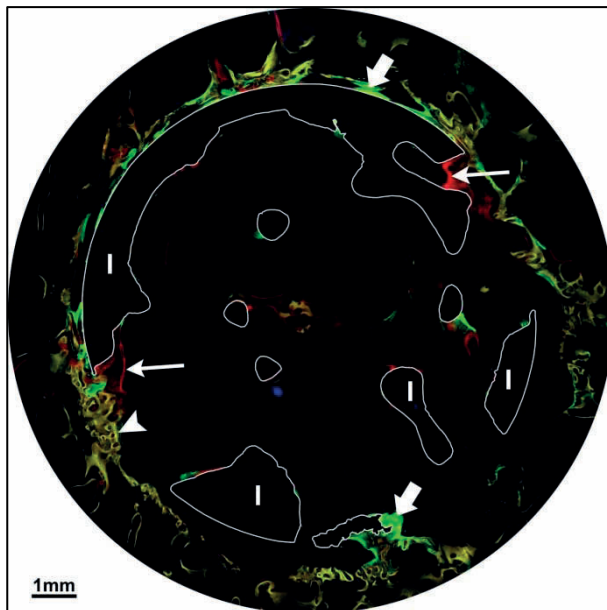


Abbildung 39: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 12 S4 unfunktionalisiertes Implantat: Die Anteile des Implantates (I) sind zur vereinfachten Differenzierung weiß umrandet. Sowohl im Lager als auch im Defektbereich lässt sich die zeitliche Abfolge der Knochenneubildung anhand der 3 verschiedenen Fluorochrome erkennen: gelb für Tetrazyklin (Pfeilkopf), rot für Alizarin (dünner Pfeil) und grün für Calcein (dicker Pfeil).

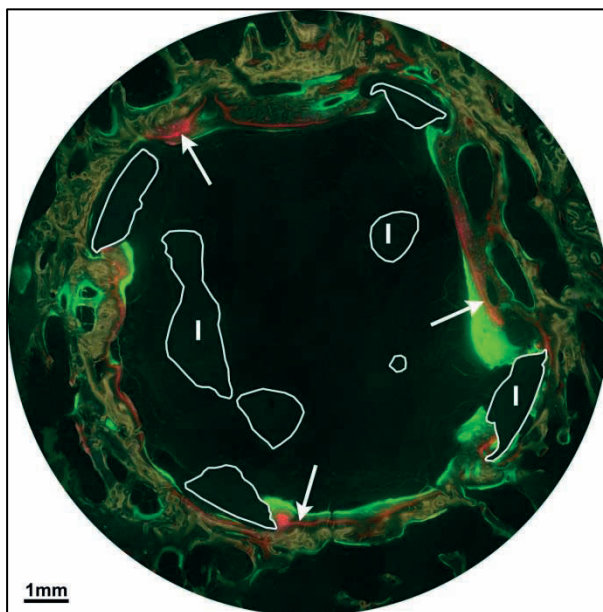


Abbildung 40: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 14 S4 I unfunktionalisiertes Implantat: In der Peripherie des Implantates (I) finden sich einige, durch Alizarin rot markierte Streifen (Pfeil) neu gebildeten Knochens.

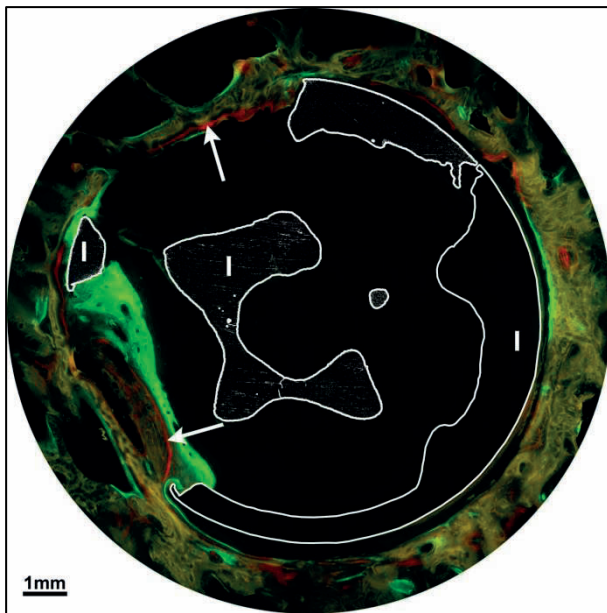


Abbildung 41: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 14 S3 funktionalisiertes Implantat: Im Bereich der Implantat-Poren entsteht neuer Knochen, der sich jedoch nicht in den Defektbereich hinein ausweitet. Schmale Alizarin-Banden (Pfeil) markieren den Knochen, der etwa nach 3 Monaten Standzeit gebildet wurde. I = Implantat

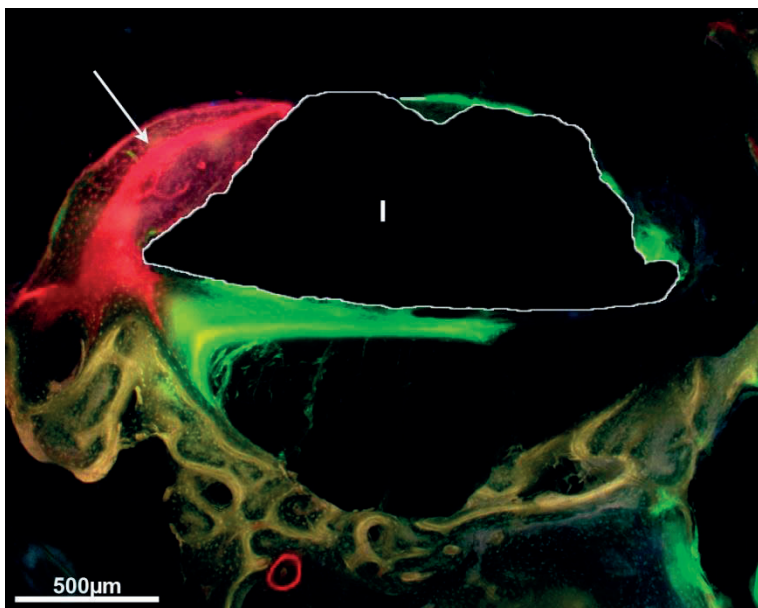


Abbildung 42: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 12 S3 unfunktionalisiertes Implantat: Aufgrund des Einsatzes dreier verschiedener Fluorochrome ist der Verlauf der Knochenneubildung gut nachzuvollziehen. Der mit Alizarin (rote Fluoreszenz, Pfeil) markierte Knochen wächst durch eine Pore im Implantat (I) am Fremdmaterial entlang in Richtung auf das Innere des Defektes (oben im Bild).

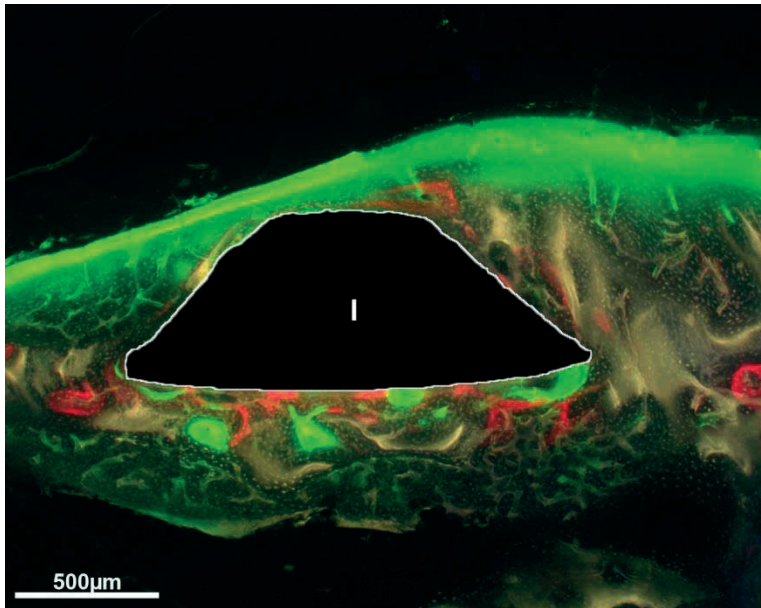


Abbildung 43: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 11 S2 funktionalisiertes Implantat: Dieser Abschnitt des Implantates (I) liegt vollständig eingebettet in einer knöchernen Matrix. An der Außenseite des Materials (im Bild unten) bilden die zu verschiedenen Zeitpunkten entstandenen und unterschiedlich farbigen Knochenabschnitte ein ineinander verwobenes Mosaik.

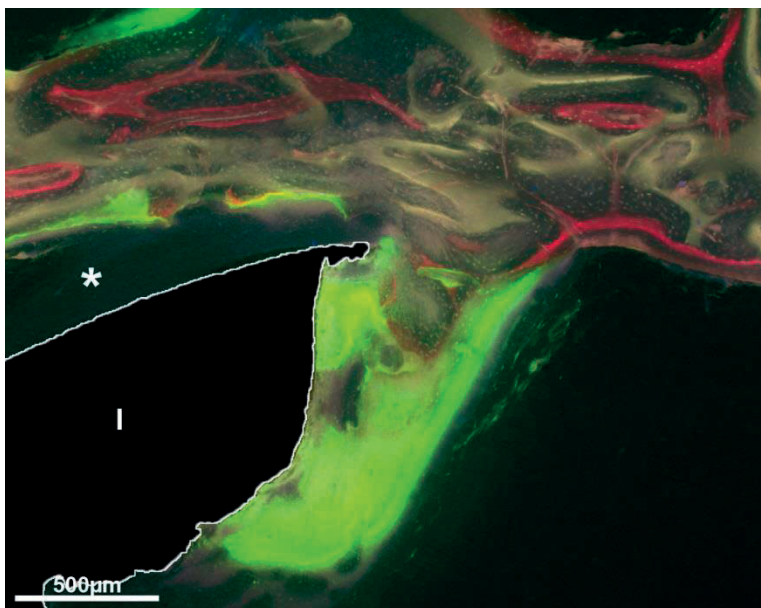


Abbildung 44: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 21 S3 funktionalisiertes Implantat: Durch Alizarin markierter Knochen (rot) findet sich vornehmlich im Lagerknochen, während der in den Defekt wachsende Knochen zu einem späteren Zeitpunkt, kurz vor der Euthanasie, entstanden ist und am Implantat (I) entlang in das Innere des Hohlkörpers zieht. An der Außenseite verbleibt zwischen Lagerknochen und Implantat ein knochenfreier Spalt (Stern).

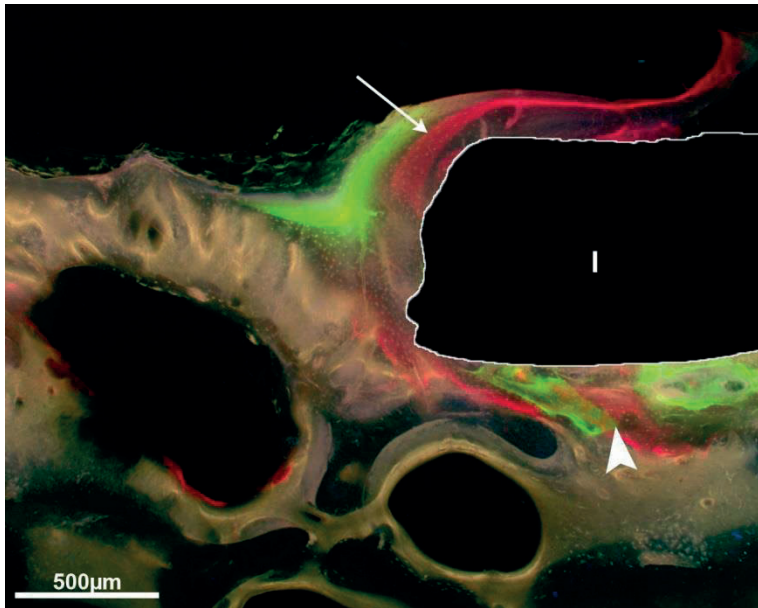


Abbildung 45: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 25 S4 funktionalisiertes Implantat: Der Knochen wächst entweder in Schichten übereinander (Pfeil), also appositionell in Richtung auf das Innere des Defektes oder abwechselnd interstitiell, wie an der Außenseite des Implantates zu sehen ist (Pfeilkopf).

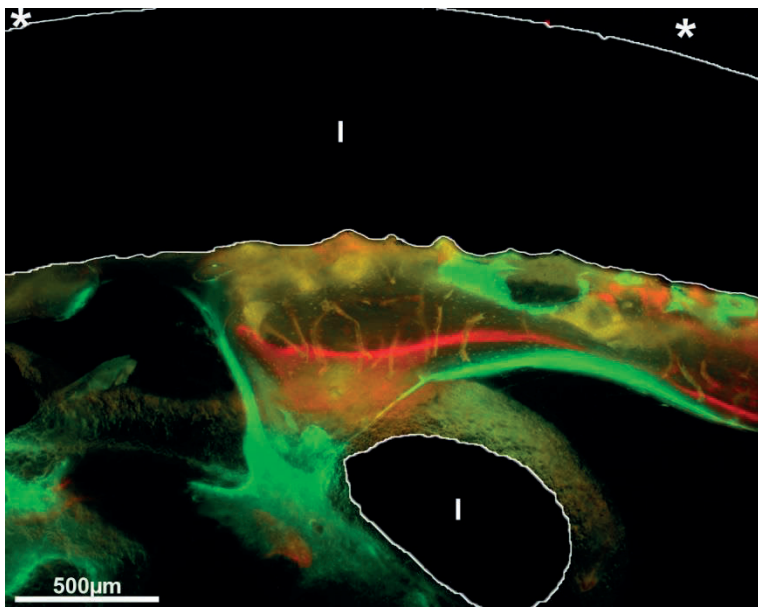


Abbildung 46: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 19 S4 funktionalisiertes Implantat: An der Innenseite des Implantathohlkörpers (I) zeigt die rote Alizarin-Fluoreszenz den Knochen, der etwa nach der Hälfte der Standzeit gebildet wurde. An der Außenseite dagegen liegt ein knochenfreier Spalt vor (Stern).

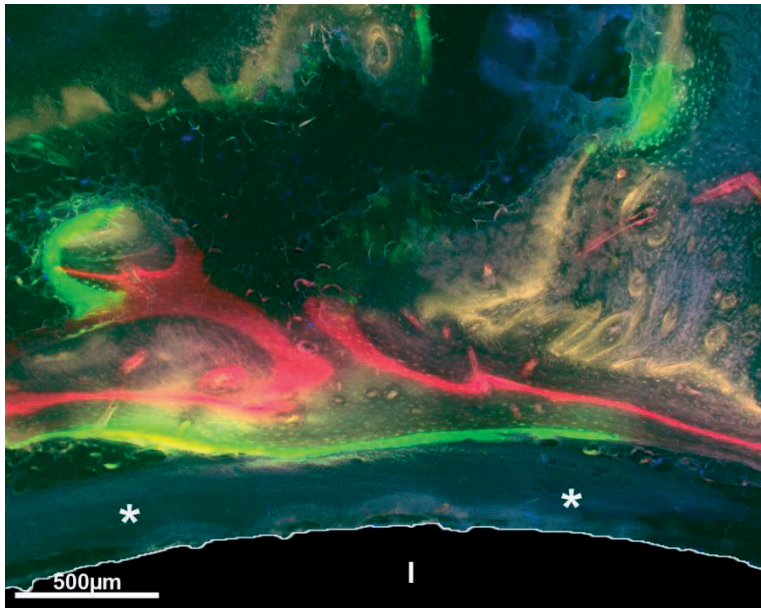


Abbildung 47: Histologie: Fluoreszenz

Schaf 10 S3 I unfunktionalisiertes Implantat:. Das Knochenwachstum geht vom Lagerknochen aus (oben im Bild) in Richtung auf das Implantat (I), erreicht dieses jedoch nicht, so dass ein knochenfreier Spalt (Stern) erkennbar ist.

3.3. Statistik und Histomorphometrie

Die Datenerhebung erfolgte an den erstellten Schliffen (Kapitel 2.4.) und der jeweiligen Histologie (Kapitel 2.5.). Nach Euthanasie wurden die funktionalisierten und unfunktionalisierten Implantate entnommen und der jeweiligen Untersuchung zugeführt. Nach einer manuellen Messung der AOI und der darin neugebildeten Knochenmenge mittels Photoshops (Adobe Photoshop CS5 extended) konnten folgende statistischen Parameter erhoben werden:

3.3.1. Knochenmenge

Als Knochenmenge wurde die Menge innerhalb der Area of Interest abzüglich des Implantates gemessen, welche repräsentativ für das neugebildete biologische Material war. Als Messgrundlage diente hier das Fluorochrom Alizarin, dessen Nachweis neugebildeten ossäre Strukturen ab dem 105. postoperativen Tag entsprach (Kapitel 2.6.1.).

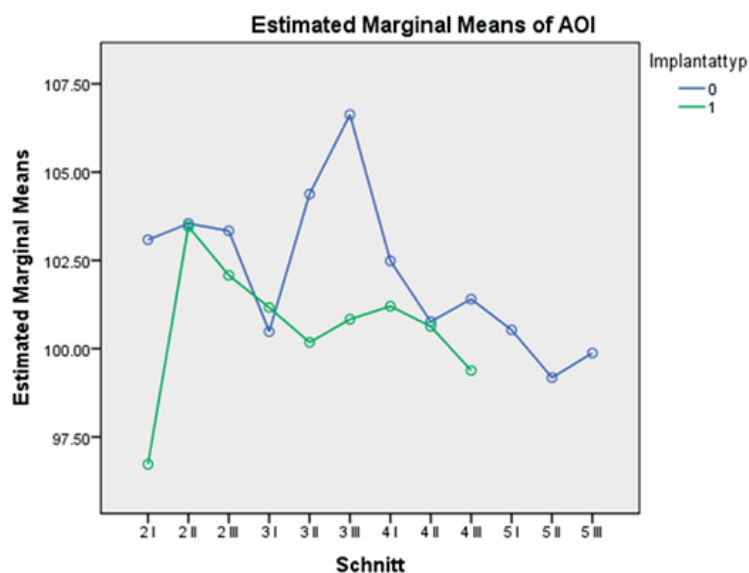


Abbildung 48: Statistik

In Bezug auf die Menge des neugebildeten Knochens im Bereich der Area of interest - jeweils in Höhe des Implantates - zeigt sich keine statistische Signifikanz zwischen den unfunktionalisierten (0) und den funktionalisierten Implantaten (1).

Der Statistik (Abbildung 48) kann entnommen werden, dass es bei den unfunktionalisierten Schliffen 3 I-III zwar zu einer höheren Knochenneubildung kam, doch ohne Signifikanz hinsichtlich der Neubildungsrate für ossäres Material. Auch dann nicht, wenn beide Testgruppen in Bezug zur Knochenneubildungsrate, der Area of

Interess, der Implantatfläche und des Fluorochroms Alizarin unter Berücksichtigung der einzelnen Knochenschliffe, verglichen wurden (Abbildung 49 und 50).

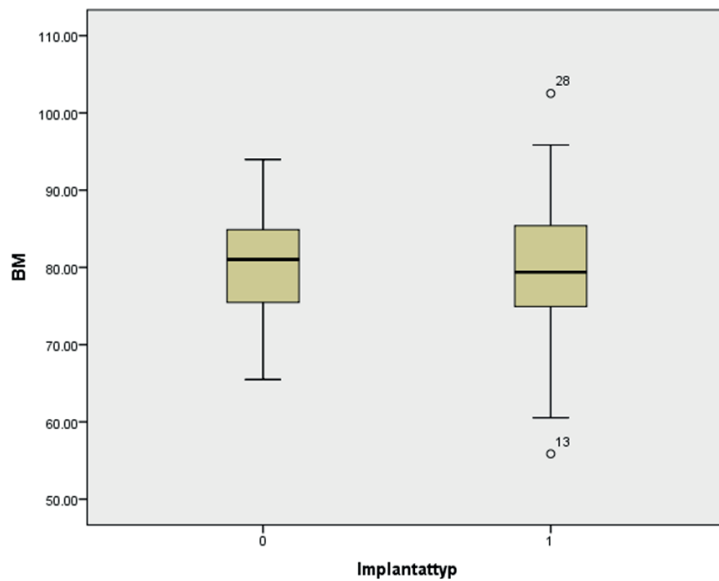


Abbildung 49: Statistik

Box- and Whisker-Plot: Verteilung der Implantate (0) unfunktionalisiert und (1) funktionalisiert. Keine statistische Signifikanz hinsichtlich des neugebildeten biologischen Materials (BM).

Nach Messung und Auswertung der neugebildeten Knochenmenge innerhalb der AOI der beiden Testgruppen (Abbildung 49) konnte keine statistische Signifikanz bewiesen werden.

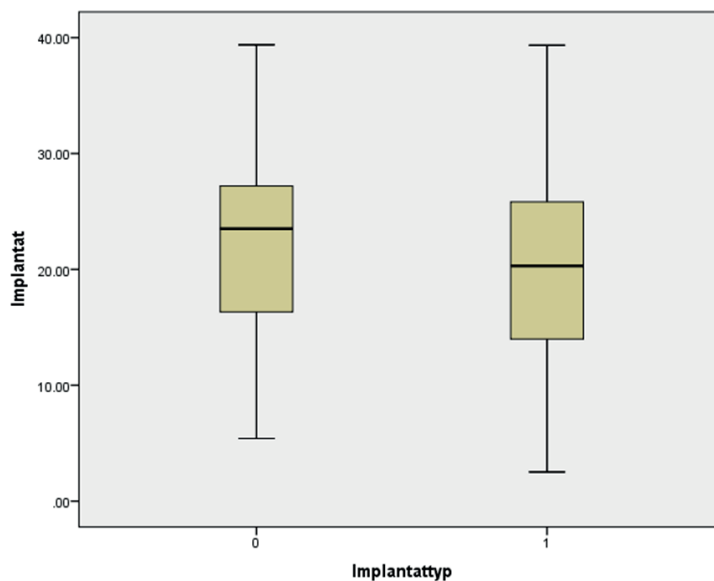


Abbildung 50: Statistik

Box- and Whisker-Plot: Bei dem Vergleich sämtlicher Ergebnisse der beiden Testgruppen, konnte keine statistische Signifikanz der funktionalisierten Implantate (1) gegenüber den unfunktionalisierten Surrogaten (0) bewiesen werden.

Datenverteilung sämtlicher histomorphometrisch aufgearbeiteter Methoden als Box- and Whisker-Plot (Abbildung 50): Sowohl bei den unfunktionalisierten als auch bei den funktionalisierten Implantaten finden sich große Ergebnisstreuungen innerhalb der Gruppe, jedoch keine implantatbezogenen Divergenzen hinsichtlich aller erhobenen Daten aus den histomorphometrischen Messungen von Toluidinblau, der alkalischen Phosphatase und Alizarin.

Tabelle 14: Vergleich der Mittelwerte

Vergleich Alizarin, Toluidinblau und alkalische Phosphatase hinsichtlich des Mittelwertes (MW ges) in mm². Mittelwert funktionalisierte Implantate (MW f) und Mittelwert unfunktionalisierte Implantate (MW uf).

	Alizarin: Neugebildeter Knochen zum Zeitpunkt der Alizarin-Gabe (3 Monate post-operativ) Anteil des Fluorochroms Alizarin (rot) zur Menge des neugebildeten Knochens	Toluidinblau: Neugebildeter Knochen nach 6 Monaten, Anteil des Knochengewebes im Defektbereich	Alkalische Phosphatase: Nachweis der alkalischen Phosphatase, Verhältnis der Enzymreaktion zur Menge des neugebildeten Knochens
MW ges Knochen	2,36 mm ²	75,75 mm ²	79,93 mm ²
MW f	3,04%	30,64 %	2,77 %
MW uf	2,69%	24,73%	1,57 %

In Tabelle 14 wurden sämtliche histologischen Mittelwerte des neugebildeten Knochens in mm² verglichen. Es zeigte sich eine geringfügig erhöhte Knochenneubildungsrate der funktionalisierten Implantate im Vergleich des Mittelwertes. Die funktionalisierten Implantate wiesen somit eine erhöhte osteoinduktive Wirkung, allerdings ohne statistische Signifikanz auf. Bei der Fluoreszenz Alizarin, bei Toluidinblau und der alkalischen Phosphatase wurden, zur Berechnung, die markierten Flächen, durch Photoshop bestimmt, herangezogen.

3.3.2. Toluidinblau

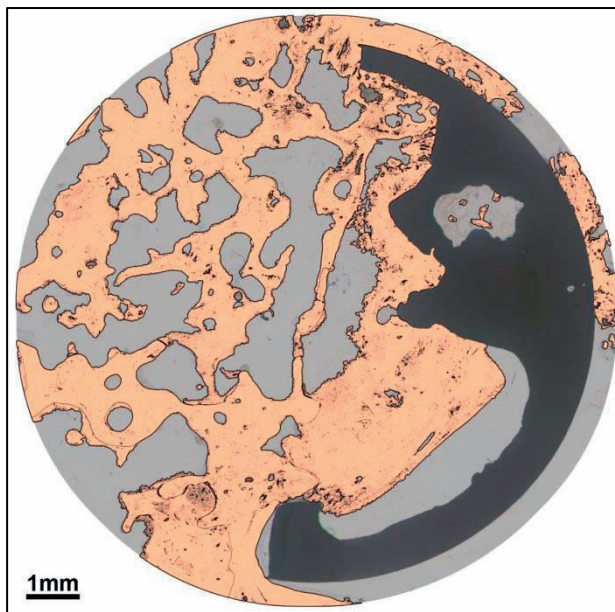


Abbildung 51: Histomorphometrie: Toluidinblau

Schaf 15 funktionalisiertes Implantat S3: In orange unterlegte manuell gemessene Knochenmenge innerhalb des Defektes.

Bei der Evaluation der Menge an neugebildetem Knochen (Abbildung 51) zeigte sich zwar ein minimal höherer Wert innerhalb der AOI (Area of Interest) bei den funktionalisierten Implantaten (30,46% im Gegensatz zu 24,73% bei den reinen Titan-Implantaten, Tabelle 14), allerdings konnte keine statistische Signifikanz bewiesen werden.

3.3.3. Alkalische Phosphatase

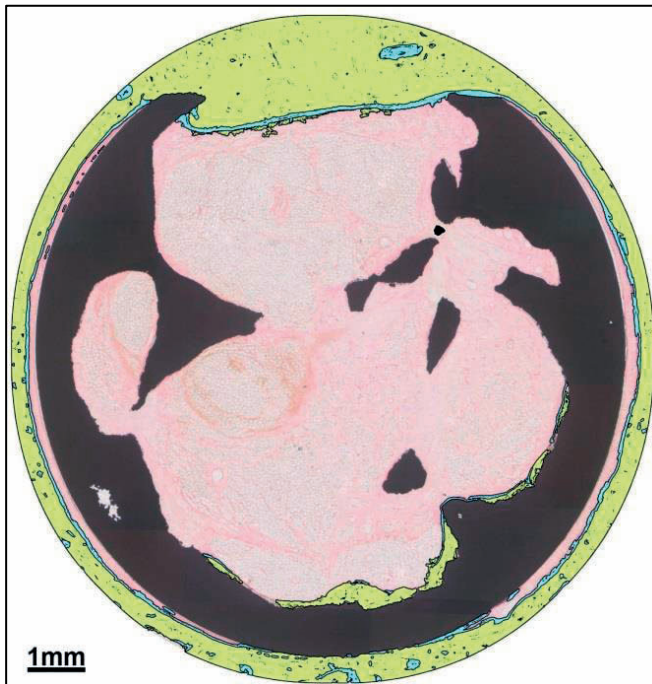


Abbildung 52: Histomorphometrie: Alkalische Phosphatase

Schaf 16 unfunktionalisiertes Implantat S2: Die manuelle Messung der Enzymaktivität der Osteoblasten (blau) und die neugebildete Knochenmenge (grün) sind unterlegt.

Bei der Ermittlung des Mittelwertes der Enzymreaktion (Abbildung 52) des neugebildeten Knochens innerhalb der Area of interest wiesen die funktionalisierten Implantate einen bedingt höheren Wert (2,77 %) im Gegensatz zu den unfunktionalisierten (1,57%) Präparaten auf (Tabelle 14). Insgesamt lag der Mittelwert der Knochenmenge bei allen Testobjekten -funktionalisierten wie unfunktionalisiert- innerhalb des Defektbereiches bei 79,93 mm². Die Bestimmung der AOI wurde analog zu Toluidinblau vorgenommen.

3.3.4. Alizarin

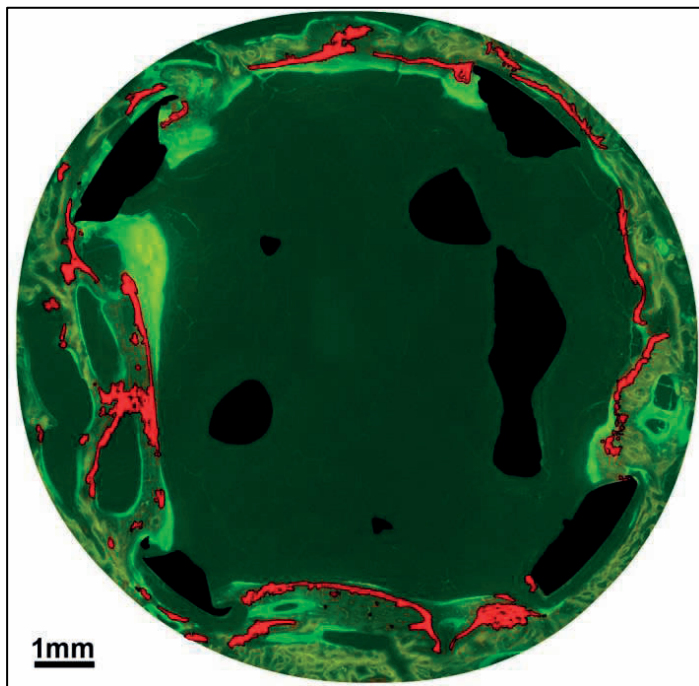


Abbildung 53: Histomorphometrie: Fluoreszenz Alizarin

Schaf 25 S5 I unfunktionalisiertes Implantat: Histomorphometrische und statistische Auswertung der Alizarin-Fluoreszenz (rote Farbüberlagerung).

Wie in Kapitel 2.6.1. erwähnt, erfolgte die Quantifizierung von Alizarin mittels Photoshop (Adobe Photoshop CS5 extended) manuell (Abbildung 53 und 54). Es konnte so die Fläche des neugebildeten Knochens nach 3 Monaten gemessen und statistisch ausgewertet werden. Insgesamt wurden 83 Schliffe manuell gemessen und deren Wert zur Auswertung (3.2.5.) herangezogen.

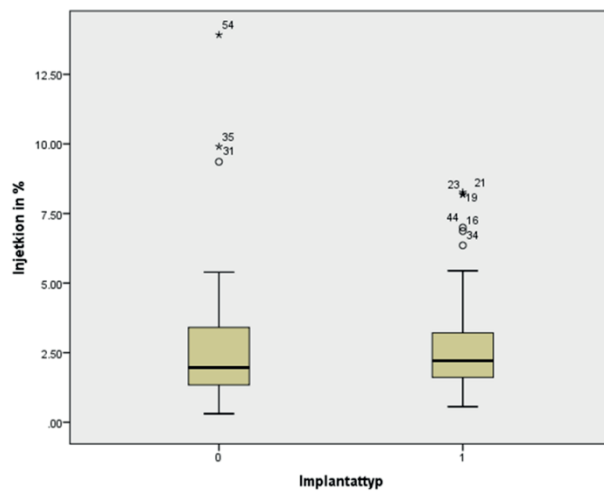
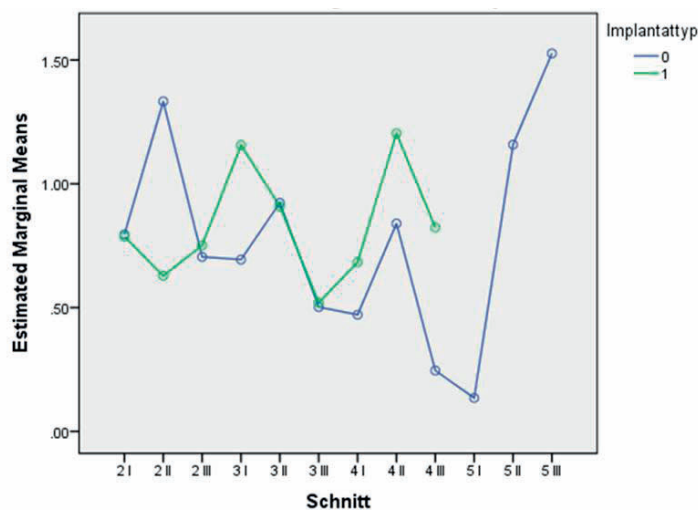


Abbildung 54: Statistik

Box-and- Whiskers-Plot der unfunktionalisierten (0) und funktionalisierten Implantate (1) bei der Messung von Alizarin in % (Injektion). Statistische Signifikanz * , Ausreißer °. Die biologische Materialbeschichtung (1) konnte gegenüber den unfunktionalisierten Implantaten keine erhöhte Knochenneubildungsrate nach einer Standzeit von sechs Monaten vorweisen.



Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: Gewicht = 77.86, Alter in Jahren = 5.64

Non-estimable means are not plotted

Abbildung 55: Statistik

Die blaue Kurve markiert die neugebildete Knochenmenge der unfunktionalisierten und grün diejenige der funktionalisierten Surrogate. Es lässt sich keine statistische Signifikanz zwischen den unfunktionalisierten (0) und den funktionalisierten Implantaten (1) erheben.

Die Abbildung 55 veranschaulicht die neugebildete Knochenmenge nach Messung der Alizarinflächen jedes Knochenschliffes (2I-5III) in Abhängigkeit der Lage im Knochen. Auch hier konnte zwischen beiden Testgruppen keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

Der Median beträgt nach histomorphometrischer Auswertung für das Fluorchrom bei den unfunktionalisierten (0) Testobjekten 1,9655 und für die funktionalisierten (1) 2,2107. Somit wurde auch in Bezug auf den neugebildeten Knochen ab dem 105. Tag *post operationem* keine Signifikanz zwischen beiden Testgruppen nachgewiesen.

3.3.5. rT-PCR

Bei einer kleinen Gruppengröße der PCR konnte keine Signifikanz in der Gegenüberstellung der mit Kalzium-Titanat funktionalisierten und der nicht-funktionalisierten Implantate nachgewiesen werden.

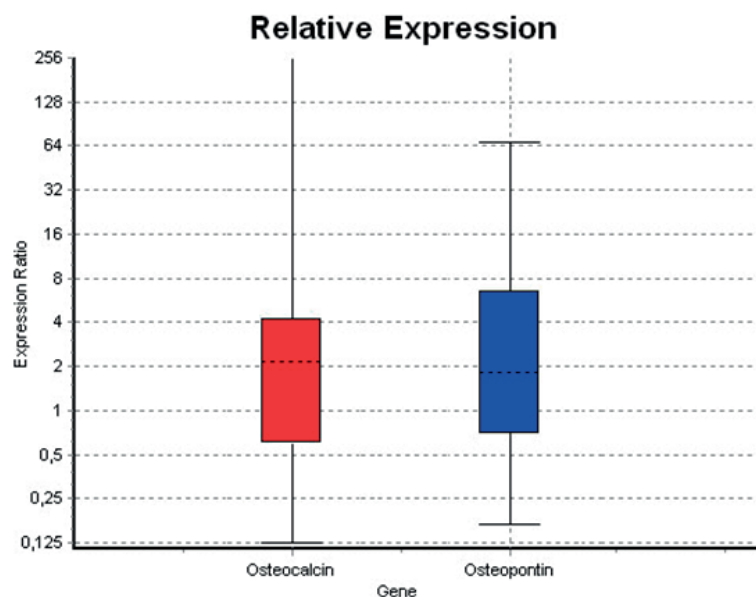


Abbildung 56: Statistik

PCR Amp/Cycle Chart; Box-and-Whiskers-Plot: Osteocalcin (rot) und Osteopontin (blau). Keine statistische Signifikanz

Aufgrund der kleinen Gruppengröße von jeweils 5 Tieren lag bei Osteocalcin eine in Relation „sehr große“ und bei Osteopontin eine „große“ Streuung vor (Abbildung 56). Somit konnte auch hier keine statistische Signifikanz bewiesen werden.

Relative Expression Results

Parameter	Value
Iterations	2000

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
Osteocalcin	TRG	0.953	3.754	0.523 - 181.419	0.137 - 832.909	0.399
Osteopontin	TRG	1.082	2.262	0.475 - 11.385	0.223 - 41.667	0.339
B2MG	REF	1.0178	1.000			

Interpretation

Osteocalcin sample group is **not** different to control group. P(H1)=0.399

Osteopontin sample group is **not** different to control group. P(H1)=0.339

Non-Normalised Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1) Result
Osteocalcin	TRG	0.953	5.214	0.644 - 69.133	0.161 - 444.421	0.174
Osteopontin	TRG	1.082	3.141	0.606 - 16.139	0.260 - 42.017	0.213
B2MG	REF	1.0178	1.389	0.500 - 3.580	0.251 - 6.707	0.494

Abbildung 57: Statistik

Die real-time-PCR - Osteocalcin und Osteopontin

Die rt-PCR ergab eine große Ergebnisstreuung bei Osteopontin und Osteocalcin innerhalb der beiden Gruppen (Gruppengröße jeweils 5 Tiere). Beide Proteine (Abbildung 57 - gelb hinterlegt) sind bei den funktionalisierten Implantaten leicht hochreguliert. β 2MG ist ein House-keeping-gene. Es markiert den Nullpunkt für die spätere Messung der cDNA und gilt als Referenzwert, der bekannt ist.

4. Diskussion

Der besondere Fokus dieses Experimentes lag vornehmlich auf der Fragestellung, ob eine Funktionalisierung mit Kalzium-Titanat zu einer besseren Osteointegration von nicht-biologischem Material führt. Mittels der polychromen Sequenzmarkierung kann die Knochenneubildung- und Knochenumbildung chronologisch nachvollzogen und somit auch indirekt nachgewiesen werden, ob die Funktionalisierung des Titans, ferner eine offenporige Struktur, tatsächlich die Biokompatibilität erhöht und so eine Osteointegration stattgefunden hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Defekt von 10 mm Durchmesser und 12 mm Eindringtiefe in der rechten medialen Femurkondyle gewählt. Die Femurkondyle als Implantationsort hat sich in zahlreichen Studien etabliert (PREDECKI et al. 1972; MARCACCI, 1999; HEISS, 2006; SKORUPA, 2009; ROBIONECK, 2010), da es ein standardisiertes Osteotomiemodell (HEISS, 2006) bietet. Weiter ist dieser Zugang mit einem geringen Gewebetrauma verbunden und der Knochen weist in dieser Lokalisation genügend Knochensubstanz auf (SKORUPA, 2009). Das Implantat kam in der Spongiosa längs zur Traglinie, ähnlich der menschlichen Tragachse, zum Liegen. Aufgrund der Tiefe und des gesetzten Defektes war keine weitere Osteosynthese vonnöten. Sechs Monate post implantationem wurden an dem aufbereiteten Knochen histologische, enzym- und immunhistochemische sowie biomechanische Untersuchungen vorgenommen, die die Reparationsphase widerspiegeln sollten. Nach der Kallus-bildenden Granulationsphase kommt es durch die Neoangiogenese im Frakturspalt zur Gefäßeinsprossung in den frakturierten Knochen und zu einer Migration von Progenitorzellen sowie Wachstumshormonen wie BMP-2 und BMP-7 (DIETZ und LITZKE, 2004). Darüber hinaus wirkt die Gefäßeinsprossung osteoinduktiv, indem sich Fibroblasten und Knorpelzellen aus dem mesenchymalen Stammzellpool herausdifferenzieren und migrieren (ELS, 1920; ROBIONECK, 2010; JANICKI et al. 2012).

Vergleicht man beide Testgruppen, so lässt sich zwar für die funktionalisierten Implantate bei den histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen eine erhöhte Knochenneubildungsrate messen, dies jedoch ohne statistische Signifikanz. Ein positiver Einfluss von Kalzium-Titanat auf die Knochenneubildung war demnach nicht festzustellen. Inwieweit dies an der Defektgröße allein gelegen haben mag, ist aufgrund fehlender Sham-OPs spekulativ. Sham-OPs sind wichtig, um einen Placebo-Effekt durch andere Faktoren, ähnlich der in der Pharmaindustrie üblichen Beeinflussungen, auszuschließen (WOLF et al. 2005). Es zeigte sich in Studien, dass Ergebnisse in der

Sham-OP zu 35 % mit denen der Test-OPs übereinstimmen (ANGELOS et al. 2003; CLARK et al. 2003; WOLF et al. 2005).

Bildmorphologisch fiel bei der Dünnschliffhistologie nach DONATH (1988) entlang der Bohrkante bei einigen Präparaten eine Spaltbildung auf, die bei beiden Testgruppen dargestellt werden konnte. Dies könnte an Mikrobewegungen des Implantates gelegen haben. Nach SOBALLE et al. (1992) verhindern diese ein knöchernes Einwachsen bei Titanimplantaten, wenn Sie $> 500 \mu\text{m}$ sind. In Ihrer Arbeit verwiesen sie auf ein vermindertes Einwachsen des Surrogates in den Empfängerknochen, nachdem es zu mechanischen Instabilitäten innerhalb der Hundefemora gekommen war. Weiter führen sie an, dass mit der Höhe der Mikrobewegungen, auch der Kollagenanteil am Interface steigt (SOBALLE et al. 1992; GRADINGER et al. 2006).

Die Implantate sollten im Idealfall "press-fit" in der Defektzone zum Liegen kommen, die gegossenen Testobjekte entsprachen jedoch nicht den geforderten 12 mm, sondern fielen kleiner aus.

Vorteile des Schaf-Tiermodells

Knochen oviner Herkunft wurden, neben porcinem Knochen, erstmals durch BAUMEISTER (1961) als Xenograft verwendet und haben sich seither in einer Vielzahl von Studien bewiesen (BARBERI et al. 2014; MIRZASADEGHI et al. 2014). Sie entsprechen hinsichtlich der Biokompatibilität, Osteointegration und in puncto Inflamationsverhalten weitestgehend dem humanen Knochen. Oviner Knochen ist daher besser geeignet als z.B. Kleintierknochen (MANDELKOW et al. 1990; REHMAN et al. 1995; WIEGHORST et al. 2006; VET et al. 2014; BARBIERI et al. 2014; MIRZASADEGHI et al. 2014). In tierexperimentellen Studien wies der ovine Knochen, im Vergleich z.B. mit denen des Kaninchens oder des Pferdes, weitestgehend Übereinstimmungen mit den Stoffwechselvorgängen des Menschen auf (WISSING et al. 1990; ANIK et al. 2014). Bei hasenartigen Kleintieren laufen die Stoffwechselprozesse mit dreifacher Geschwindigkeit ab und die Wachstumsgeschwindigkeit ist, im Vergleich zu derjenigen im menschlichen Körper, 40fach erhöht (CLASSEN, 2006), sodass die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können (EITEL et al. 1981; FLAUTRE et al. 1999).

Zu erwähnen ist auch, dass der Knochenstoffwechsel und damit die Regeneration bei adulten Säugetieren, im Gegensatz zu juvenilen Säugetieren, insgesamt erniedrigt ist (LAUSMANN, 2004). Ferner sollte die Skelettentwicklung bei dem Versuchstier abgeschlossen sein. Somit ist bei Merino-Landschafen mit einem Altersdurchschnitt von

drei Jahren der Knochenstoffwechsel ähnlich dem des Patientenkollektives, bei welchem der Knochenersatz hauptsächlich angewendet wird. Auch wurde in hinreichend vielen Studien gezeigt, dass bei dem Schaf eine Gewichts-Knochen-Relation ähnlich dem des Menschen vorliegt und die Knochenstruktur sowie das Immun-, Blut- und Lymphsystem weitestgehend mit dem des Menschen homolog sind (HARDOUIN et al. 1992; KESSLER et al. 2002; BLATTERT et al. 2003; ZHANGHUA 2005; NIHOANNEN et al. 2008; KARACAYLI et al. 2009; ROBIONECK 2010).

Knochenersatz Kalzium-Titanat

Knochen ist, nach Blut, das am zweithäufigsten transplantierte Gewebe im Menschen. Die Spenderzahl ist begrenzt, eine Eigenspende zieht meist Zweit-OPs mit entsprechenden Risiken nach sich und xenogene Transplantationen sind ebenso mit einem erhöhten Infektionsrisiko behaftet. Entsprechend wurde in den letzten zwei Jahrzehnten (TYLISCZAKA, 2014) massiv an einem idealen Knochenersatzmaterial mit möglichst geringen bis keinen Risiken für den Patienten geforscht. Daraus resultierten Knochenersatzmaterialien nicht-natürlichen Ursprungs wie Keramiken, Metalle, Polymere und Zemente. Zu den Keramiken zählen sowohl das Hydroxylapatit als auch die bioaktiven Gläser. Beide zeigen eine erstaunlich hohe Bioaktivität, jedoch können sie im Gegensatz zu Titan keine mechanisch tragende Funktion einnehmen. Beispielsweise sind häufig beschriebene Probleme bei der Anwendung von Kalzium-Phosphaten die Bildung von Bindegewebskapseln, eine Abstoßungs- und Entzündungsreaktion, ausgelöst durch die Hydroxylapatit-Teilchen, sowie eine Seromen- und Nekrosebildung (BLOKHUIS et al. 2000; RAMMELT et al. 2002; SCHMIDMAIER et al. 2002) mit einer daraus resultierenden Wundheilungsstörung. Daneben muss seine mangelnde Osteointegration mit einer Funktionalisierung, wie beispielsweise bei der Arbeit von RAMMELT et al. (2002) mit Kollagen Typ I, verbessert werden. Titan und seine Legierungen wurden, nicht zuletzt aufgrund ihrer primären Belastungsstabilität, Korrosionsbeständigkeit (TEXHAMMAR et al. 1994; DAQING et al. 2007) und ihrer geringen Neigung zu Abstoßungsreaktionen (FROSCH et al. 2002; RUDY et al. 2002) intensiv als Substitutor in das menschliche Skelettsystem eingesetzt.

Der Hauptvorteil bioaktiver Kompositgemische liegt darin, dass die Materialien jeweils aus zwei Phasen unterschiedlicher natürlicher Eigenschaften bestehen und somit auch divergente Funktionen und Strukturen, im Gegensatz zu ihrem ursprünglichen Ausgangspunkt, übernehmen können (VILLALPANDO-REYNA et al. 2011). Nachteilig hingegen ist ihre geringe mechanische Belastbarkeit (FROSCH et al. 2002), sodass ihr Einsatzbereich in der Knochenersatztherapie restringent ist. Abhängig von der

Eigenschaft des Interfaces zwischen dem Kalzium-Titanat und dem Empfängerknochen können diese Substanzen entweder bioinert oder bioinduktiv sein. Infolgedessen durchlaufen sie Prozesse der Auflösung oder des Niederschlages. Dies führt zu einer festen Bindung zwischen Knochen und Ersatzmaterial (DE BRUIJIN et al. 1992; SCHNETTLER et al. 1997 und 2004; LEGEROS, 2004). Um eine höhere Osteointegration des Metalls zu gewährleisten, muss Titan vorher bioinert werden. Titan alleine besitzt eine geringere Osteointegration als Kalziumphosphate wie Apatite, Zemente, Biogläser oder Bioglaskeramiken (HOFMANN et al. 2002; SULTANA et al. 2006; SCHNETTLER et al. 2006). Die Biokompatibilität kann mithilfe biokonduktiver Beschichtungen an deren Oberfläche geschehen und sie somit verbessern. Aufgrund der Beschaffenheit des Knochens als Kalziumspeicher, bietet sich eine Funktionalisierung von Scaffolds mit CaTiO_3 (Kalzium-Titanat) an. Trotzdem kam es zu keiner signifikanten Knochenneubildungsrate bei dieser Studie. Es ist zu diskutieren, woran dies gelegen haben mag.

Die gegossenen Implantate mussten vorab mit Fluss- und Salpetersäure angeätzt werden, um die lückenlose Bildung der Reaktionsschicht zu gewährleisten. Das Elektropolieren und die damit einhergehenden Ätzzvorgänge an der gedrehten äußeren Oberfläche der Implantate führten scheinbar zu einer erniedrigten Knochenadhäsion in diesem Bereich. OLIVARES-NAVARRETE et al. (2012) beschreiben in ihrer Arbeit, dass mit Zunahme der Rauigkeit eines Implantates auch die Zellpopulation der Osteoblasten und damit die Knochenregeneration zunehme. Auch PREDECKI et al. (1972) postulierten, dass Oberflächen von Implantaten nicht zu glatt sein sollten, da sonst Knochenzellen nicht mehr adhären und migrieren könnten. In der Dentalchirurgie werden angeraute Oberflächen sogar als Goldstandard betrachtet (Schlottig, 2010). Dass die Adhäsion der Knochenbildner an Titanoberflächen stattfindet, wurde in hinreichend vielen Arbeiten gezeigt (WEI et al. 2007; OLIVARES-NAVARRETE et al. 2012; GITTENS et al. 2012; STRAUSS et al. 2013). Es ist demzufolge anzunehmen, basierend auf zuvor genannter Literatur und den hier vorliegenden Ergebnissen, dass eine erhöhte Rauigkeit und damit modifizierte Oberflächenbeschaffenheit, die Zelladhäsion, auch ohne Wachstumsfaktoren oder Ähnliches, erhöht (OLIVARES-NAVARRETE et al. 2012). Dies könnte ein Grund für die Spaltbildung an der Implantat-Knochengrenze und das mäßige Einwachsen des Knochens in das Implantat sein.

Implantat und Biomechanik

Die Titanimplantate sollten den physikalischen und mechanischen Eigenschaften der menschlichen Spongiosa nachempfunden werden. Diese schwammartige menschliche Knochenstruktur entspricht einer Größenordnung von 80 ppi. Um später „press-fit“ in den Defekt (Abbildung 58) des Diamond-Bone-Cutting-Systems zu passen, wurde jedes Implantat in zu einem zylindrischen Rotationskörper gegossen.

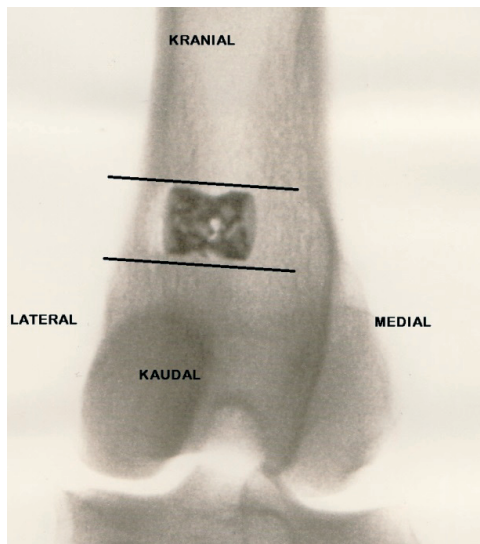


Abbildung 58: a.-p. Röntgenbild

Schaffemur: Implantat liegt press-fit im Bohrkanal. Das Röntgenbild stammt aus den Testoperationen bereits entnommener Schaf-Femora. Im eigentlichen Versuch wurde der Defekt medial gesetzt.

Die gegossenen Testobjekte, Größe 10 x 12 mm, zeigten eine Porosität von 10 ppi, statt der vorgesehenen 20 bis 30 ppi. Es zeigte sich in einer von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Kooperationsarbeit, dass die interkonnektierenden Strukturen im Gießvorgang nicht filigraner hergestellt werden konnten. Unter einer Stegbreite von 0,3mm konnten Modelle nicht gleichmäßig reproduziert werden (HAGEMANN, 2012). Erst nachdem die Stegdurchmesser auf mindestens 0,5 mm vergrößert wurden, konnte ein wiederholter Gießvorgang das Ergebnis reproduzieren (HAGEMANN, 2012). Jedoch ist davon auszugehen, dass dies keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Osteointegration oder auf die Knochenregeneration nimmt (PREDECKI et al. 1972). Diese Behauptung kann durch die Arbeit von HOFMANN et al. (2002) untermauert werden. Sie zeigten, dass sich bei demineralisierter Knochenmatrix - im Vergleich zu anderen Surrogaten wie autoklavierten Knochen oder Hydroxylapatit - eine erhöhte osteoblastische Proliferation provozieren ließ. Knochenähnliche Trabekelstrukturen können im Umkehrschluss die

Osteogenese und Osteoinduktion maximieren. FROSCH et al. (2002) postulierten, dass eine Porengröße von 600 µm bei Titanimplantaten optimale Bedingungen für eine Osteointegration darstellen. Im Gegensatz dazu beschreibt JÄCKEL (2012), dass auch wenn die Trabekelstruktur zu groß sei, dies einen Vorteil für die Defektheilung berge. Diese Aussage bestätigen die experimentellen Arbeiten von KAHNBERG (1979) und MELCHER (1969), in denen ein erhöhter Knochenumsatz, nach mechanischer Behinderung der Migration von Bindegewebe in den Defektbereich, nachgewiesen wurde. Hieraus lässt sich Folgendes schließen: Die Trabekelgröße und damit die Primärstabilität nimmt entscheidenden Einfluss auf die Osteointegration. Es fehlt dem Knochen, im Sinne eines Remodellings, der Anreiz, selbst die Stützfunktion zu übernehmen und einzuwachsen. Dies könnte des Weiteren eine zusätzliche Erklärung für unseren Befund liefern, dass der Knochen nicht oder nur selten direkt an die Außenseite des Implantates herab wächst.

Titanlegierungen haben von Natur aus einen höheren Elastizitätsmodul (55 -116 GPa) als der spongiöse Knochen (14 - 22 GPa). Die Belastung auf die Gliedmaße wird somit von dem Implantat abgefangen, sodass der Knochen keine mechanische Veranlassung sieht, in den durch das Implantat stabilisierten Defekt einzuwachsen. Diese These wird durch die Arbeit von GIRÓN (2012) bestärkt. Girón, der Push-Out-Ergebnisse der hier zu untersuchenden Implantate vorlegte, wies in seiner Arbeit auf, dass der Elastizitätsmodul des Knochenersatzes bei 5010 ± 1098 MPa lag und diese Werte mehr als genug seien, um die Last des Schafes auf den Knochen zu übertragen. Ähnliche Ergebnisse zeigen oder beschreiben auch andere Arbeiten (HENRICI, 2006; FRANKE, 2007). Der Reiz für eine Invasion von Knochengewebe könnte daraufhin hinfällig geworden sein und einen Erklärungsansatz bieten, weshalb kaum neugebildeter Knochen innerhalb der Titanimplantate zu detektieren war. In einer ähnlichen Arbeit (RUDY et al. 2002), mit einer Standzeit von ebenfalls 6 Monaten, konnte bei Titanimplantaten in Rattenfemora eine signifikant ($p < 0,01$) erhöhte Osteogenese bei Titanimplantaten im Vergleich zu Aluminiumoxid (61,3 % vs. 42,6 %) nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe beschreibt weiter, dass es sich vor allem um eine initial erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit des Knochens handelte. Auch SCHMIDMAIER et al. (2002) zeigten, dass bei mit Hydroxylapatit funktionalisierten Titanimplantaten eine erhöhte Signifikanz hinsichtlich der aufzubringenden Kraft bei der Biomechanik mittels Push-out-Tests bei den funktionalisierten gegenüber den unfunktionalisierten Testobjekten nachzuweisen war. Der verminderten Knochenneubildungsrate in der vorliegenden Arbeit müssen also andere Ursachen zugrunde liegen. Anzumerken ist auch, dass durch individuelle anatomische Differenzen (altersbedingt, kongenitale

Fehlbildungen mit verändertem Q-Winkel) nicht bei allen rechten medialen ovinen Femurkondylen der exakt gleiche Implantationsort gewährleistet werden konnte. Aufgrund dessen lag das Implantat im Sinne eines Anreizes zur Knochenneubildung nicht immer im idealen Verhältnis zum Kraftvektor. Vermutlich ist nicht nur aus diesen Gründen bei allen Testobjekten die Knochenneubildung vornehmlich auf die Randbereiche des Implantates konzentriert, während das Innere des Defektes weitestgehend knochenfrei blieb. Dieses Phänomen wurde auch in anderen Studien beschrieben (SCHÜTTRUMPF, 2010; JÄCKEL, 2013).

Frakturheilung und Versuchsdauer

Die Knochendefektheilung kann je nach Fraktur im Allgemeinen in eine primäre und sekundäre Defektheilung eingeteilt werden. Bei der vorliegenden Arbeit handelt sich um eine sekundäre Frakturheilung. Post implantationem gliedert sich die Knochenheilung in drei Abschnitte. Die Akut- oder Entzündungsphase definiert sich durch rupturierte Blutgefäße, aus denen Wachstumsfaktoren freigesetzt werden und darüber eine hochselektive Kaskade eingeleitet wird. Über Chemokine werden Osteoblasten und Osteoklasten aus mesenchymalen Stammzellen regeneriert, welche die nächste Phase der Heilung einleiten. Dieser Vorgang nimmt bis zu mehrere Stunden in Anspruch. Im fließenden Übergang wird der Thrombus durch Granulationsgewebe (zweite Phase) ersetzt und die Reparationsphase eingeleitet. Diese dauert zwischen drei Wochen und vier Monaten (WISSING et al. 1990). Durch die Neoangiogenese im Frakturspalt kommt es zur Einsprossung in den frakturierten Knochen. Dies kann zum Beispiel durch die Besiedlung von adipogenen Stammzellen (ADSC) auf Scaffolds beschleunigt werden (KLOETERS et al. 2010). Am Ende wird der Knorpel über Wachstumsfaktoren zu Geflechtknochen kalzifiziert. Mit dem Remodelling des Knochens und damit der letzten Phase, im Durchschnitt 4 Monate nach der Fraktur beginnend (WISSING et al. 1990), kommt es durch verschiedene Scher- und Zugkräfte zu einer Ausbildung eines Lamellenknochens, was individuell mehrere Jahre in Anspruch nehmen kann. Aus diesem Grund wurde eine Standzeit post operationem von 6 Monaten gewählt, um zu gewährleisten, dass es im Knochen bereits zu einem Remodelling gekommen ist, sowie um darüber hinaus zu evaluieren, ob eine Osteointegration des Implantates erfolgte und die Reparationsphase bereits abgeschlossen war. Eine längere Standzeit hat sich auch in anderen Studien bewährt und ist von Vorteil für experimentelle Studien zur Untersuchung der Defektheilung an langen Röhrenknochen (ROBIONECK, 2010; SCHÜTTRUMPF, 2010). Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Arbeit war ebenso, dass eine polychrome Markierung mit Fluorochromen erfolgte, denn dies verdeutlichte den zeitlichen Ablauf der Knochenneubildung, ohne die Notwendigkeit zusätzliche

Versuchstiere einzusetzen. Die histomorphometrische Auswertung des Farbstoffs Alizarins zeigte, dass das Remodelling bis zum Zeitpunkt der Euthanasie anhielt.

Ergebnisse der Histomorphometrie

Die Histomorphometrie erlaubt die quantitative Messung von Knochengewebe während des Remodellings. Dies lässt am Ende eine statistische Aussage über die Ergebnisse zu (LANG 2013). Knochendichtemessungen oder biochemische Knochenmarker sind im Vergleich zur Histomorphometrie nicht in der Lage, eine präzise Charakterisierung des Knochenumsatzes zu liefern (COMPSTON, 1998). Die Festlegung der AOI und die manuelle Markierung der darin zu untersuchenden Implantat- und Knochenstrukturen, sind aufgrund der Abhängigkeit des Untersuchers (SKORUPA, 2009) äußerst störanfällig. Aus diesem Grund wurden die Messungen nur durch einen Untersucher durchgeführt.

Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das Phosphat z.B. von Proteinen oder Nukleotiden im alkalischen Bereich abspaltet. Dieses Enzym wird von Osteoblasten, Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen sezerniert (SPIEGEL et al. 2006). Die Expression dieses Enzyms belegt somit nur im Sinne eines indirekten Nachweises eine osteoblastische Aktivität. Eine Knochenzellformation konnte durch die Histomorphometrie nachgewiesen werden. Die Defektzone ist von multinukleären Osteoklasten und Osteoblasten umgeben. Da die Osteoblasten aufgrund ihrer maturalen Stadien unterschiedliche Formen und zytoplasmatische Dichten aufweisen können (EINHORN, 1998 und 2005), wurden diese indirekt mit der alkalischen Phosphatase nachgewiesen. Der Nachweis der alkalischen Phosphatase in Knochenproben, die Implantaten mit der bioaktiven Kalzium-Titanat-Schicht enthielten, zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede gegenüber denen mit unfunktionalisierten Formkörpern. Eine ähnliche Studie wurde 2014 von Saito et al. veröffentlicht, in der poly(lactic acid) (PLLA)- und poly-ε-caprolactone (PCL)- Scaffolds mit der gleichen Porosität und mit Kalzium-Titanat beschichtet, verglichen wurden. Auch hier konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Da bei den Schliffen auffiel, dass sich die Farbtintensität auch am Implantat-Interface und neben dem Fettmark finden ließ, könnte es sich neben den Osteoblasten auch um mesenchymale Stammzellen oder Fibroblasten handeln (WIEGHORST, 2006), zumal gerade hier die Reaktionsschicht eine Bioinduktion und somit eine Knochenneubildung bzw. Bindegewebsbildung aus dem Mesenchym anregt.

Nach einer Standzeit von sechs Monaten erfolgte die Euthanasie der Tiere. Es zeigt sich in der Histomorphometrie mittels alkalischer Phosphatase, dass vor allem um das funktionalisierte Implantat am Randbereich eine besonders hohe Konzentration dieses Enzyms vorlag. Dies demonstriert einen hohen Knochenumsatz, da durch dessen Anwesenheit die Extrazellulärmatrix mineralisiert wird (REIF, 2007). Auch hier wurde wiederum bei allen Präparaten im Defektinneren weniger Enzym nachgewiesen, als es um das Kalzium-Titanat-Implantat an der Bohrkante der Fall war (Abbildung 29). Dies mag auf die zuvor beschriebene Primärstabilität des Implantates zurückzuführen sein oder auf den Umstand, dass die Trabekelstrukturen zu groß waren, um den Knochenzellen als Leitschiene zur Zellmigration zu dienen.

Toluidinblau

In der Arbeit von CLASSEN (2006) wurde die von Kossa-Färbung als Standardfärbung für Knochenschliffe angesehen. Toluidinblau bietet allerdings den Vorteil, dass sie eine standardisierte Färbemethode bietet und sich die Zellstrukturen durch ihre Metachromasie leichter differenzieren lassen als bei der von Kossa-Färbung. Mineralisiertes Hartgewebe bleibt blau, wohingegen Mastzellgranula violett dargestellt werden (LANG, 2006). Weichgewebe kann ebenfalls besser durch die Toluidinblau-Färbemethode dargestellt werden (MAI, 2003). Die von Kossa-Färbung hingegen ist ein indirekter Nachweis des Knochengewebes, da es die Kalziumionen indirekt nachweist. Es kommt über eine Silbernitratlösung zu einer Reaktion des Knochengewebes und damit zu einem Verdrängen der Kalziumionen (LANG, 2006) und mineralisiertes Gewebe wird schwarz dargestellt (HANDSCHEL, 2007). Durch die von Kossa-Färbung lässt sich also lediglich mineralisiertes Hartgewebe, nämlich mineralisierte Extrazellulärmatrix der Osteoblasten (HANDSCHEL, 2007), sprich das Endprodukt, darstellen, nicht jedoch zelluläre Elemente selbst und Weichgewebe (MAI, 2003). Da die Frakturheilung über 3 Phasen (Kapitel 1.4.2.) und mitunter über Weichgewebe abläuft, wurde aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit die Toluidinblau-Färbung angewendet, da eine erhöhte Knochenneubildungsrate durch die Funktionalisierung evaluiert werden sollte, welches das Weichgewebe mit einschließt. Es zeigte sich eine deutliche Neubildung von Toluidinblau-angefärbtem Lamellenknochen und regelmäßige Anbauten an den Surrogat-Oberflächen mit einer teilweisen Spaltbildung. Der Knochen wies ein zentripetales (SCHNETTLER et al. 2003) Einwachsverhalten auf, war jedoch vornehmlich auf den Randbereich begrenzt. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Studien beschrieben. Jäckel (2013) führt dies auf einen Vorfall von Muskelgewebe in

den Defekt zurück. Dies kann durch die Arbeiten von MELCHER (1969) und KAHNBERG (1979) bestätigt werden, die darin eine verminderte Knochenregeneration durch die Invasion von weichem Gewebe in den Defektbereich beschreiben, da hierdurch die Regeneration mechanisch gehemmt wird. Ein Vorfall von Weichteilgewebe lag bei dieser Arbeit nicht vor, doch könnte es durch die Porengröße zu einer mechanischen Hemmung der Osteogenese gekommen sein. Die sogenannten „Bone lining cells“ am Implantat-Interface gelten als aktive kettenartig angeordnete Fibroblasten-Vorläufer, die sich direkt an das Implantat anlagern. Ihre Funktion ist noch nicht abschließend erklärt (DEVLIN, 2014). Interessanterweise zeigen sich diese allerdings nicht an jeder Surrogat-Oberfläche. Ein Vorhandensein war allerdings sowohl bei den mit biologischer reaktiver Substanz versehenen, als auch bei den Titan-Implantaten ohne Kalzium-Titanat der Fall.

α -Smooth Muscle Actin

Dass eine adäquate Angiogenese zu einem erhöhten Knochenstoffwechsel und damit zu einer verbesserten Regeneration des frakturierten Knochens führt, ist aus zahlreichen Arbeiten bekannt (ELS, 1920; BAROU et al. 2002; MEKRALDIE et al. 2003; ROBIONECK, 2010; JÄCKEL, 2013). Bei einer Knochenfraktur wird durch osteoklastäre Enzyme und einer komplexen Kaskade VEGF freigesetzt und somit nicht nur die Angiogenese, sondern auch die enchondrale Ossifikation provoziert (ROBIONECK, 2010). Es ist also für die Knochenbruchheilung von entscheidender Bedeutung, dass eine suffiziente Vaskularisierung und Fibroblastenmigration in der Reperationsphase (GRADINGER et al. 2006) stattfindet. Um dies auch bei der vorliegenden Studie zu untersuchen, wurde mit α -SMA (Alpha-Smooth Muscle Actin) die Gefäßneubildung ermittelt. Dies stellt eine Färbemethode zum Nachweis von Myelofibroblasten bzw. deren Mikrofilamenten dar. Die Funktion dieser Zellen ist hauptsächlich die Zell-Matrix-Verbindung, um die Mechanik in der Zelle zu dirigieren (KINNER et al. 2002; DUSTMANN, 2007). Auch Chondrozyten sind in der Lage, ASMA zu exprimieren und Kollagen-Matrix zu kontrahieren (KINNER et al. 2002). Darüber hinaus produzieren Myelofibroblasten neben inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, sogenannte Matrixmoleküle, wie Kollagen, Glykosaminoglykane, Tenascin und Fibronektin (POWELL et al. 1999; JANU, 2011). Dadurch fördern diese Zellen eine Heilung, indem sie Stammzellen anlocken und ernähren (PELED et al. 1991; SCHMITT-GRÄFF et al. 1991; POWELL et al. 1999).

Histologisch lassen sich die Blutgefäße und damit die sie umgebenden Myelofibroblasten als solche erkennen. Positive Reaktionen mit dem Antikörper gegen

α -SMA erfolgten weniger an der Implantat-Knochen-Grenze, sondern in Nähe der Bohrkante. Nachdem es sich vornehmlich um Myelofibroblasten handelt und es im Zuge der Reparationsphase zu einer Neoangiogenese kommt, lässt sich nicht feststellen, ob die Funktionalisierung mit Kalzium-Titanat zu einer Vaskularisation führte oder es bei der Phylogenese im Rahmen der Defektheilung (JANU, 2011) ohnehin zu einer Migration von Myelofibroblasten gekommen wäre. Da aber bei beiden Testgruppen die mit ASMA angefärbten Zellen gleichmäßig verteilt waren, ist anzunehmen, dass die Funktionalisierung nicht zu einer vermehrten Gefäßeinsprossung führte.

Das Vorhandensein von Fettmark bei wenig Granulationsgewebe lässt darauf schließen, dass die Knochenneubildung im Inneren des Implantates abgeschlossen ist.

Fluoreszenz

Mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe Alizarin, Calcein und Tetracyclin konnte die Knochenneubildung in chronologischer Reihenfolge verfolgt werden. Durch Chelatbildung mit Kalzium in der Mineralisierungsphase des Knochens ist gewährleistet, dass lumineszente Farbstoffe genau den Zeitpunkt markieren, an dem er dem sie Knochen neu gebildet wurde. Somit mussten die Tiere nicht vorzeitig euthanisiert werden, um eine Aussage über die Knochenneubildungsrate zu verschiedenen Zeitpunkten treffen zu können.

In allen Präparaten lassen sich kräftige grüne (Calcein) und rote (Alizarin) Banden antreffen, wenngleich man das gelbe Fluorochrome (Tetracyclin) teilweise nur schwer von den grünen Fluoreszenzen unterscheiden kann. Bemerkenswert ist jedoch, dass sich die gelben Fluoreszenzen, ausgelöst durch die postoperative Tetracyclin-Gabe, in jedem Präparat finden lassen. Dies mag darin begründet sein, dass Tetracyclin bereits am 28. postoperativen Tag und Calcein erst am 168. Tag post operationem appliziert wurde. Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass Tetracyclin auf die Zahn- und Knochenneubildung Einfluss nimmt (FINERMAN et al. 1963; MEFFERT et al. 1970; MÜNZENBERG et al. 1970; TAPP 1970) und eine Akkumulation von Tetracyclin im Knochengewebe einen verringerten Mineralisierungsgrad zur Folge hat (MÜNZENBERG et al. 1970). FINERMAN et al. (1963) zeigten, dass Tetracyclin vor allem bei der unmittelbar mineralisierten Knochematrix anzutreffen ist, sodass mittels Fluorochrome Knochengewebe zum Zeitpunkt der Applikation nachgewiesen werden kann. Bei der Auswertung wurde festgestellt, dass die zeitliche Abfolge der Synthese des Knochens nach einer Standzeit von sechs Monaten in manchen Präparaten schwer zu differenzieren war. Möglich wäre auch, dass im Zuge des Remodellings, welches sich durch Um- und Abbauvorgängen definiert, die gelbe Fluoreszenz bereits abgebaut

wurde und somit nach der Euthanasie nicht mehr bzw. in zu geringer Konzentration nachgewiesen werden konnte. SCHNETTLER et al. (1993) und WIEGHORST (2006) beschrieben ebenfalls, dass es im Zuge der Reparationsphase zu einer Resorption des Tetracyclins kommt.

Ergebnisse der rt- PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient der Amplifikation eines bestimmten DNA-Stranges in vitro, im vorliegenden Projekt spezifisch dem indirekten Nachweis der Osteoblasten- Aktivität durch dessen Proteine Osteopontin und Osteocalcin. Es wurden fünf Tiere jeder Gruppe für die RT-PCR aufbereitet. Dabei ist anzumerken, dass die rt-PCR nicht den Gehalt, sondern die Möglichkeit der Bildung von Osteocalcin und –pontin nachweist. Weder bei Osteokalzin noch bei Osteopontin stellte sich eine Signifikanz hinsichtlich des Expressionsverhaltens heraus. Nicht- statistisch signifikante Werte bei kleinen Gruppengrößen (hier $n = 5$) können sich bei einer größeren Versuchsgruppe als signifikant erweisen (SKORUPA, 2009). Aus diesem Grund sollte in zukünftigen Studien die Anzahl der zu untersuchenden Tiere erhöht werden, wenn davon auszugehen ist, dass die Testsubstanzen nur marginale Unterschiede zu erwarten lassen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich eine Funktionalisierung mit Kalzium-Titanat nicht als vorteilig im Sinne einer erhöhten Knochenneubildungsrate ergeben hat. Ein bindegewebig oder mit Fettmark ausgefüllter Spalt zwischen Implantatoberfläche und neu gebildetem Knochen wurde bei Tieren beider Testgruppen nachgewiesen und ist am ehesten auf die zuvor beschriebene Primärstabilität des Implantates bzw. der zu großen Trabekelstruktur innerhalb des Surrogates zurückzuführen. Das Knochenersatzmaterial war in Zusammenschau aller Ergebnisse somit zwar nicht osteoinduktiv, jedoch osteokonduktiv, da es dem Knochen als Leitgerüst zum Einwachsen bietet. In zukünftigen Studien wäre eine zusätzliche Funktionalisierung mit osteoinduktiv Substanzen wie BMP denkbar, da diese die Knochenentwicklung positiv beeinflussen (HANDSCHEL 2007). Den Ergebnissen dieser Studie nach zu urteilen und im Vergleich zu anderen Studien, ist autologer Knochenersatzstoff weiterhin als Goldstandard (SCHNETTLER et al. 2003) zu betrachten. Jedoch sollten, aufgrund der klinischen Relevanz des Knochenersatzes, in weiterführenden Studien, modifizierte Knochenersatzstoffe als Hybride getestet werden. Weiterhin ist in zukünftigen Studien Einsatz von mikro-Computer-Tomographie neben der histomorphometrischen Untersuchung empfehlenswert, da somit die Ergebnisse nicht nur quantifiziert, sondern auch qualifiziert werden können (CHRISTOU et al. 2014).

5. Zusammenfassung

5.1. Deutsch

Nicht immer lässt sich in der Chirurgie ein Knochendefekt durch die autologe Spende suffizient substituieren. Bis heute ist es Gegenstand der Forschung, das ideale Knochenersatzmaterial herzustellen.

Ziel dieser tierexperimentellen Arbeit war es herauszufinden, ob die Funktionalisierung eines gegossenen offenporigen Titanimplantates durch Kalzium-Titanat zu einer besseren Osteointegration im Vergleich zu einem nicht funktionalisierten Pendant führt. Die histologischen, enzym- und immunhistochemischen, histomorphometrischen sowie molekularbiologischen Methoden dienten dabei der Charakterisierung der Knochenneubildung. Während aus ethischen Gründen nur eine einzige Standzeit von 6 Monaten *post implantationem* gewählt wurde, war mit Hilfe der polychromen Sequenzmarkierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen *in vivo* ein zeitlicher Ablauf der Knochenneubildung darstellbar. 24 adulten Merino-Landschafen wurden zylindrische, 10 x 12 mm große, offenporige (10ppi) Titankörper (Ti-6Al-7Nb) in einen durch das Diamond-Bone-Cutting-System reproduzierten Defekt, in die rechte mediale Femurkondyle implantiert. Die Hälfte der Implantate wurde vorab mit einer Kalzium-Titanat-Reaktionsschicht funktionalisiert, um so eine Osteointegration und Osteokonduktion anzuregen. Während der Standzeit kam es zu einer polychrome Sequenzmarkierung jeweils post-operationem mit folgenden Fluorochromen: Tag 28/ 35 Tetracyclin, Tag 105 Alizarin und Tag 168/175 Calcein.

Es erfolgte eine Euthanasie nach einer Standzeit von sechs Monaten. Die Femurkondylen mitsamt Implantat wurden entnommen, in Technovit®9100Neu eingebettet und schließlich Knochenschliffe hergestellt. Somit konnten anschließend fluoreszenzmikroskopische, standardhistologische, enzym- und immunhistochemische sowie histomorphometrische Auswertungen der Knochenmenge und der Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie die Darstellung der Blutgefäße im Defektbereich mittels α -SMA, erfolgen. Um die Expression von Osteopontin und Osteocalcin zu bestimmen wurde des Weiteren eine rt-PCR durchgeführt.

Bei der Ermittlung des Mittelwertes der Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase des neugebildeten Knochens innerhalb einer *Area of interest* (AOI), die den Defektbereich plus einem Randbereich von 100 μ m umfasste, wiesen die funktionalisierten Implantate einen bedingt höheren Wert (2,77 %) im Gegensatz zu den unfunktionalisierten (1,57%) Präparaten auf, die allerdings nicht statistisch signifikant waren. Insgesamt lag der

Mittelwert des biologischen Materials bzw. der Knochenmenge, bei allen Testobjekten, also sowohl funktionalisiert wie auch unfunktionalisiert, innerhalb des Defektbereiches bei 79,93 mm².

Der Mittelwert beträgt nach histomorphometrischer Auswertung für das Fluorchrom Alizarin bei den unfunktionalisierten Testobjekten 1,9655 mm² und für die funktionalisierten 2,2107 mm². Somit wurde auch in Bezug auf den neugebildeten Knochen ab dem 105. Tag post operationem kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Testgruppen nachgewiesen werden.

Bei der Evaluation der Menge an neugebildeten Knochen zeigte sich zwar ein minimal höherer Wert innerhalb in der AOI (*Area of interest*) bei den funktionalisierten Implantaten mit 30,46%, im Gegensatz zu den reinen Titan-Implantaten mit 24,73 %, allerdings konnte keine statistische Signifikanz bewiesen werden.

Bei der histomorphometrischen und statistischen Auswertung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Testgruppen. Die Funktionalisierung der Titanlegierung mit Kalzium-Titanat-Reaktionsschicht zeigte somit insgesamt keinerlei Einfluss auf die Knocheneinheilung der Titan-Implantate.

5.2. Summary

The following research project was financed by the German Research Foundation and particularly discusses the influence of the functionalization of an open-pored cast titanium base alloy with a calcium-titanate reaction layer, implanted into adult Merino land race sheep during a long time experiment. The experiment was carried out with special regard to the osseous integration of the above mentioned material as well as to

the osteoplastic activity. Cylindrical-moulded titanium implants in size of 10 ppi were implanted into the left medial femurkondyle of twelve adult Merino land race sheep.

In advance, half of the implants were functionalized with a calcium titanate reaction zone. During lifetime fluorochromes were injected into the animal at three different times in order to evaluate a polychrome sequence labeling.

The sheep were euthanized six month after initial implantation. The femurkondyles were removed, newly embedded into Technovit ®9100 and bone micro sections were prepared.

They conducted to fluorescence-microscopical, standard-histological as well as to enzyme-chemical and immunohisto-chemical and histomorphometrical evaluation of bone quantity, of the activity of the alkaline phosphatase and to the imaging of the vessels in the defect-area.

Furthermore, the relative expression of osteopontin and osteocalcin was determined by means of a real-time polymerase chain reaction.

During histomorphometrical evaluation of the fluorochrome-labelled bone a minimally higher formation – though statistically insignificant – appeared in the presence of the functional implants compared to the controls.

Just as well a slightly higher activity of the alkaline phosphatase as well as a slightly increased relative expression of osteocalcin and osteopontin were observed (statistically insignificant, too).

Bone formation (ossification) primarily concentrated on peripheral areas of the implant, while the inside of the implant mostly remained free of bone-augmentation.

There did not appear to be any great difference in osteointegration between the analyses of the not-functionalized controls and the calcium-titanate reaction layer - functionalized open-pored cast titanium base alloy, when running the experiment with adult Merino land race sheep.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Abendroth K, Der Osteoblast: Funktion und hormonelle Regulation. 1992; In: Aktuelle Aspekte der Osteologie, pp 3-9, Springer Verlag, Heidelberg
- (2) Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. 2010; J. Bone Miner. Res. 25 (4): 695–705. doi:10.1359/jbmr.090832. PMID 19775205.
- (3) Angelos P. Sham surgery in research: A surgeon's view. Am J Bioeth. 2003. Fall. p. 65
- (4) Anik Chevrier A, Kouao ASM, Picard G, Hurtig MB, Buschmann MD. Interspecies comparison of subchondral bone properties important for cartilage repair. 2014; J Orthop Res. 2015 Jan;33(1):63-70
- (5) Azzopardi PV, O'Young J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. Roles of electrostatics and conformation in protein-crystal interactions. 2010; PLoS ONE 5 (2): e9330. doi:10.1371/journal.pone.0009330.
- (6) Barbieri G, Barbieri CH. A comparative in vivo ultrasonometric evaluation of normal and delayed fracture healing in sheep tibiae. Clinics (Sao Paulo). 2014; Sep;69(9):634-40Barbieri
- (7) Barou O, Mekraldi S, Vico L, Boivin G, Alexandre C, Lafage-Proust MH. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. Bone. 2002; 30(4):604-12.
- (8) Barros NM, Hoac B, Neves RL, Addison WN, Assis DM, Murshed M, Carmona AK, McKee MD. Proteolytic processing of osteopontin by PHEX and accumulation of osteopontin fragments in hyp. mouse bone, the murine model of X-linked hypophosphatemia. 2013; J. Bone Miner. Res. 28 (3): 688–99. doi:10.1002/jbmr.1766. PMID 22991293
- (9) Bartels F. Histomorphometrische Untersuchungen der Knochenstruktur am ovariectomierten Göttinger Minischwein zur Etablierung eines Großtiermodells zur Simulation der postmenopausalen Osteoporose. 2011
- (10) Bartl R. Osteoporose – Diagnostik, Prävention und Therapie. 2012; Lege artis
- (11) Baslé MF, Lesourd M, Grizon F, Pascaretti C, Chappard D. Type I collagen in xenogenic bone biomaterial regulates attachment and spreading of osteoblast via the $\beta 1$ integrin subunit, 1998; Der Orthopäde;, Volume 27, Issue 2, pp 136-142

- (12) Bauermeister A. Klinische Erfahrungen mit dem Kieler Span. 1961; Langenbecks Arch. klin. Chir. 298, 239
- (13) Berens A, Schliephake H, Dilmaghani S, Schuste A. Einfluss von Glaskeramiken auf die Knochenneubildung in Calvariadefekten, Experimentelle Untersuchung. Mund Kiefer GesichtsChir 2000; 4 [Suppl 2]: S522–S526 Springer-Verlag
- (14) Bertram C. Plasmazytom. in Fortbildung Osteologie 1 2006
- (15) Bhatt RA, Bone graft substitutes. Hand Clin. 2012, 28(4); 57-68
- (16) Blattert T, Delling G, Weckbach A. Evaluation of an injectable calcium phosphate cement as an autograft substitute for transpedicular lumbar interbody fusion: a controlled, prospective study in the sheep model. European Spine Journal, April 2003; Volume 12, Issue 2, pp 216-223
- (17) Blencke BA, Alletsee P, Brömer H, Pfei E. Untersuchungen über die Reaktion von Weichgeweben auf glaskeramische Implantate, 1975; Arch.orthop.Unfall-Chir.82,135-146
- (18) Blokhuis T, Termaat MF, den Boer FC, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. Properties of Calcium Phosphate Ceramics in Relation to Their In Vivo Behavior. Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care: 2000; Volume 48, Issue 1 - p 179
- (19) Börner M (Experimentelle Grundlagen und klinische Erfahrung bei der Anwendung allogener Spongiosa; 1985; Akt. Traumatol. 15:210-218
- (20) Buchholz J, Skripitz R, Schnettler R. Nanopartikulärer Hydroxylapatit in der Behandlung von Frakturen und Knochendefekten in der Orthopädie und Unfallchirurgie. 8. Dortmunder Unfallchirurgie und Orthopädietagung „Homo Reparandus“. Biomaterialien in der Orthopädie und Unfallchirurgie 2003: 1–8
- (21) Büttner R, Thomas C. Allgemeine Pathologie. Schattauer Verlag, 2003; Seite 169
- (22) Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice, 2014; J Mater Sci: Mater Med, pp 1-14
- (23) Ching-Chang K, Somerman MJ, An KN. Engineering of functional skeleton bone Tissues, 2007; Motion and Bone Regeneration, pp 110-129
- (24) Christou C, Oliver RA, Pelletier MH, Walsh WR. Ovine model for critical-size tibial segmental defects. Comp Med. 2014; 64(5):377-85
- (25) Cicciu M, Craniofac J. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promote and stabilize hard and soft tissue healing for large mandibular new bone reconstruction defects. J Craniofac Surg 2014; 25: 860–862

- (26) Claes L. Biologie und Biomechanik der Osteosynthese und Frakturheilung, Orthopädie und Unfallchirurgie, up2date 2006; 1(4): 329-341, DOI: 10.1055/s-2006-944574,
- (27) Clark CC. The physician's role, "sham surgery," and trust: A conflict of duties? Am J Bioeth. 2003. fall. p. 57.
- (28) Claßen T. Quantitative histomorphometrische Analysen der Osteotomiezone nach Applikation eines neuen resorbierbaren und degradierbaren Knochenklebers, Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung. 2006
- (29) Compston J. Methods in Bone Biology, 1998, pp 177-197 Bone histomorphometry, Springer Verlag
- (30) De Bruijn JD, Klein CPAT, De Groot K. The ultrastructure of the bone-hydroxyapatite interface in vitro. J Biomed Mater Res 1992; 26:1365–82.
- (31) Devlin M. The bone–fat interface: basic and clinical implications of marrow adiposity. Review, The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2014
- (32) Devlin M. The bone–fat interface: basic and clinical implications of marrow adiposity. 2014; Review, The Lancet Diabetes & Endocrinology
- (33) Dietz O, Litzke LF. Lehrbuch der allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner. 2004, Seite 246, Enke Verlag im MVS Medizinische Verlage Stuttgart GmbH & Co. KG
- (34) Donath K. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht-schneidbaren Geweben und Materialien. 1988; Der Präparator 34: 197–206
- (35) Drenckhahn D. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem, 2002; 17. Auflage
- (36) Dustmann M. Histologische und immunhistologische Untersuchungen zum Transplantat-Remodeling nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes mit freiem autologen und allogenen Sehnen transplantat. 2007
- (37) Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998; (355 Suppl):S7-21.
- (38) Einhorn TA. The science of fracture healing. J Orthop Trauma. 2005; 19(10 Suppl):S4-6
- (39) Eitel F, Jacobson W, Schweiberer L. Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology. 1981; Arch Orthop Trauma Surg; 99(1): 59-64.
- (40) Els H. Über Schicksal und Anpassung frei transplantierte Knochenstücke in großen Defekten langer Röhrenknochen. Ein Beitrag zur Kenntnis von der

- funktionellen Knochenstruktr, aus der chirurgischen Universitätsklinik Bonn. 1920
Anatomische Hefte
- (41) Finerman GAM, Milch RA. In vitro Binding of Tetracyclines to Calcium. 1963; Nature 198, 486 – 487
- (42) Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaitre J, Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental Study in sheep. Bone 1999; 25(2 Suppl):35-39
- (43) Franke M. Geweberegeneration und Biokompatibilität nach Implantation von Hydroxylapatitpolyethylen (Hapex) in Weichgewebe und Ulnadefekten beim Kaninchen. 2007
- (44) Froesch ER. Pathophysiologie Knochen-, Calcium- und Phosphatstoffwechsel. Heidelberger Taschenbücher Volume 101, 1976; pp 194-199
- (45) Frosch KH, Sondergeld I, Dresing K, Rudy T, Lohmann CH, Rabba J, Breme J, Stürmer KM. Beschleunigung der Osseointegration von Titanimplantaten durch Besiedelung mit pluripotenten, mesenchymalen Vorläuferzellen, Chirurgisches Forum 2002, Volume 31 of the series Deutsche Gesellschaft für Chirurgie pp 453-455
- (46) Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R, Bone Morphogenetic Proteins in clinical Applications O. Fracs, Volume 77, Issue 8, 2007, Pages 626–631 Journal of ANZ Surgery
- (47) Girón TG. Properties and application spectrum of cast porous implants made of Ti-6Al-7Nb in coated and uncoated conditions. Dissertation, Universität Siegen; 2012
- (48) Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD. Differential Responses of Osteoblast Lineage Cells to Nanotopographically-Modified, Microroughened Titanium-Aluminum-Vanadium Alloy Surfaces Biomaterials. Dec 2012; 33(35): 8986–8994
- (49) Gotzen L, Garrel v T, Hofmann C, Knochenersatz, Aktueller Stand und Perspektiven, Unfallchirurgie in Deutschland, 1997; Seite 394-421
- (50) Goutam M, Giriya pura C, Mishra SK, Gupta S. Titanium Allergy: A Literature Review. Indian J Dermatol. 2014 Nov-Dec; 59(6): 630
- (51) Gradinger R, Gollwitzer H. Ossäre Integration, Springer Verlag, 2006, pp 35 -47 und 51-61
- (52) Gradinger R, Menger H, Meyer M. Chirurgisches Forum und DGAV Forum, Für experimentelle und klinische Forschung, 2010; pp 81-82, Springer Berlin Heidelberg

- (53) Grifka J Krämer J. Orthopädie Unfallchirurgie, Springer Verlag, 2013, Seite 32-35
- (54) Gutwald N, Gellrich C, Schmelzeisen R. Einführung in die zahnärztliche Chirurgie: Für Studium und Beruf. 2010, Deutscher Ärzte-Verlag; Auflage: 2., Seite 420
- (55) Hagemann K. Gießtechnische Herstellung offenporiger Implantate aus Ti6AlZnNb. Dissertation RWTH Aachen, 2012
- (56) Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. 2001; J Bone Joint Surg AM 83 (3): 428-436
- (57) Harges J, Gosheger G, Streibbürger A. Benigne Tumoren der Bewegungsorgane: Infectious spondylitis and its differential diagnosis; up2date 2014; Orthopädie und Unfallchirurgie; 9(4): 307-335 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
- (58) Hardouin P, Chopin D, DeVuyver B, Flautre B, Blary MC, Guigui P, Anselme K. Quantitative histomorphometric evaluation of spinal arthrodesis after biphasic calcium phosphate ceramic implantation in sheep. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1992; Volume 3, Issue 3, pp 212-218
- (59) Heimke G, Griss P, Jentschura G, Werner E. Die Aussagefähigkeit histologischer Befunde zur Beurteilung von Knochenersatzwerkstoffen. Arch Orthop Traumat Surg 91, 1978; Issue 4, pp 267-276
- (60) Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke Th, Resorbierbare Knochenersatzmaterialien, Eine Übersicht kommerziell verfügbarer Werkstoffe und neuer Forschungsansätze auf dem Gebiet der Komposite, Orthopäde 2011; 40:761–773
- (61) Heisel J. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kallusformation durch Hydroxylapatit-Injektion. 1987
- (62) Heiss C, Kraus R, Schluckebier D, Stiller AC, Wenisch S, Schnettler R. Bone adhesives in trauma and orthopedic surgery. Eur J Trauma. 2006; 32:141–148
- (63) Heiss C. Biokompatibilität, Degradation und Verbundfestigkeit eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers in der Traumatologie und operativen Orthopädie. 2006. Habilitationsschrift Giessen
- (64) Hench L. The story of Bioglass®, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, November 2006, Volume 17, Issue 11, pp 967-978
- (65) Henrici M. Vergleichende biomechanische Untersuchungen zur Tripodenstruktur zementfreier Endoprothesen. 2006
- (66) Herfurth N, Ketscher N, Köhler M., Gießereitechnik kompakt - Werkstoffe, : Verein Deutscher Gießereifachleute, 200 Seiten mit zahlreichen Tabellen und Bildern sowie einem Anhangteil; 2003; Giesserei Verlag Düsseldorf

- (67) Herold G. Innere Medizin; 2011
- (68) Herr G, Schmid U, Hotz G, Reutter K, Schnettler R., Einfluß verschiedener Desinfektions-und Sterilisationsverfahren auf die biologische Aktivität und Struktur von Knochengewebe; 1997; In: Schnettler R, Markgraf E (Hrsg) Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren
- (69) Heuck A, Stäbler A, Wörtler K, Steinborn M. Gutartige knochenbildende Tumoren, Radiologe 2001; 41:540-547
- (70) Hierholzer C, Perl M, Friederichs J, Woltmann A, Bühren V. Beckengürtel und untere Extremität, Pseudarthrosen des Femurs, Infectious spondylitis and its differential diagnosis. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date 2014; 9(2): 135-153, DOI: 10.1055/s-0033-1357909 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart • New York
- (71) Hofmann A, Hofmann CH, Konrad L, Schnabel M, Gotzen L. Tissue engineering des Knochengewebes - Einfluss verschiedener Trägermatrices auf die Proliferation und die Differenzierung der humanen Osteoblasten. Chirurgisches Forum 2002, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie Volume 31, 2002, pp 449-451
- (72) Hovy L. Klinische Manifestation von tumorinduzierten Osteolysen und chirurgischer Therapie, 2001; pp 11-21, Bisphosphonattherapie von Knochenerkrankungen
- (73) IMC, <http://www.med-college.hu/de/wiki/artikel.php?id=85&lan=1>, 20.03.2016
- (74) Implants of Titanium Alloy, http://www.bam.de/de/kompetenzen/fachabteilungen/abteilung_5/fg54/fg54_medien/fg54-poster_new_procedure_calcium-containing.pdf, 24.07.2015
- (75) Jäckel S. Rekonstruktion von kritischen Knochendefekten am Kiefer immundefizienter Ratten durch xenogene Transplantation humaner adulter fettabgeleiteter Stammzellen. Dissertation; 2012
- (76) Jacob HAC. Materialverhalten (Knochen und Implantatwerkstoffe) bei mechanischer Beanspruchung, 2011; Kapitel 4, Seite 30
- (77) Jansohn M, Rothhämel S, Gentechnische Methoden, 2012, 5. Auflage, Springer Verlag, Seite 237
- (78) Janu F. Untersuchung zur Knochendefektheilung unter Einfluss thrombozytärer Wachstumsfaktoren nach Implantation eines Knochenersatzstoffes auf Hydroxylapatitbasis. Dissertation Universität Giessen, 2011
- (79) Jastrow, H, Miniaturbildübersicht Knochen (Ossa) + Knochenbildung (Ossifikation), <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMKnochen.html>, 22.06.2015

- (80) Johnson AL. Fracture healing. In: AO principles of fracture management in the dog and cat. 2005, Stuttgart: Thieme. page 73
- (81) Jung GY, Park YJ, Han JS. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, May 2010; Volume 21, Issue 5, pp 1649-1654
- (82) Kaack U. Die proximale Femurfraktur des alten Menschen:Therapiekonzepte und Ergebnisse einer retrospektiven Studie, Dissertation; 2000
- (83) Kaire M. Medtronic Infuse Bone Graft Legal Timeline, Medical Malpractice, 2013
- (84) Karacayli U, Gunduz O, Salman S, Ozyegin LS, Agathopoulos S, Oktar FN. Effect of Sintering Temperature on Mechanical Properties and Microstructure of Sheep-bone Derived Hydroxyapatite (SHA). 13th International Conference on Biomedical Engineering, IFMBE Proceedings Volume 23, 2009; pp 1271-1274
- (85) Kaydel M. Untersuchung zur Dynamik der Knochendefektheilung bei der Ratte am standardisierten Bohrlochdefekt in denFemurkondylen, Dissertation; 2001
- (86) Kessler S, Mayr-Wohlfart U, Ignatius A, Puhl W, Claes L, Günther KP. Histomorphological, histomorphometrical and biomechanical analysis of ceramic bone substitutes in a weight-bearing animal model. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, February 2002, Volume 13, Issue 2, pp 191-195
- (87) Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, Mellström D. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. 2009; J. Bone Miner. Res. 24 (5): 785–91. doi:10.1359/jbmr.081234. PMID 19063687.
- (88) Kinner B, Zaleskas J, Freyman T, Thon KP, Spector M. Wachstumsfaktoren regulieren die Expression von Smooth Muscle Actin und die Kontraktilität humaner Chondrozyten in einer Kollagen-Glycosaminoglycan Matrix. Chirurgisches Forum 2002; Volume 31 of the series Deutsche Gesellschaft für Chirurgie pp 457-459
- (89) Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie der Universitätsklinik Heidelberg, Pseudarthrose, <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Knochenbruch-Pseudarthrose.118361.0.html>, 13.07.2015
- (90) Kloeters O, Berger I, Megerle K, Ryssel H, Pelzer M, Germann G. Revascularization and osteocytic repopulation of avital cortical bone with vascularised scaffold seeded with osteogenic induced adipose-derived stem cells (O-ADSC) in a rabbit model. In: R. Gradinger et al. Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2010, Springer Medizin Verlag Heidelberg
- (91) Komiya K, Nasuno S, Uchiyama K, Takahira N, Kobayashi N, Minehara H, WatanabeS, Itoman M. Status of bone allografting in Japan - Nation-wide survey

- of bonegrafting performed from 1995 through 1999. *Cell Tissue Bank* 2003; 4(2-4):217-220
- (92) Kuster M, Grifka J. Orthopädie und Unfallchirurgie, Kapitel 19 Frakturen, Gelenk- und Weichteilverletzungen, 2011; Page 366-368, Springer Verlag
- (93) Lang G. Histotechnik, Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2013, Springer Verlag, Kapitel 6.5.9.
- (94) Lang G. Histotechnik, Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. Springer 2006; Seite 78-79
- (95) Laurencin C, Khan Y, El-Amin S F. Bone graft substitutes. *Expert Review of Medical Devices*, 2006; 3(1): 49–57
- (96) Lausmann K. Langzeitversuch zur Knochenwirkung einer marginalen Zink-Versorgung an adulten Ratten. 2004
- (97) Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. 2007; *Cell* 130 (3): 456–69. doi:10.1016/j.cell.2007.05.047. PMC 2013746. PMID 17693256.
- (98) LeGeros RZ, Daculsi G. In vivo transformation of biphasic calcium phosphate ceramics: ultrastructural and physicochemical characterizations. In: Yamauro, Hench L, Wilson-Hench J, eds. *Handbook of bioactive ceramics*, vol II. Boca Raton: CRC Press, 1990:17–28.
- (99) LeGeros RZ, LeGeros JP. Bone substitute materials and their properties. In: Schnettler R, Markgraf E, Hrsg. *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*. Stuttgart–New York: Thieme, 1997:12–8.
- (100) Lichtinger TK, Schürmann N, Müller RT. Frühlockerungen eines zementierten Hüftendoprothesenstiels aus Titan. 2000; *Unfallchirurg* 103, 956-960. *Unfallchirurg Springer-Verlag*
- (101) Linhart W, Briem D, Peters A, Lehmann W, Windolf J, Rueger JM. Resorbierbare Kalziumphosphat-Zemente, 2004; *Trauma Berufskrankheit* 6:277–284
- (102) Ludwig H, Deicher H. Multiples Myelom, in *Kompodium Internistische Onkologie* 1997; pp 323-347
- (103) Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie, 2012; Thieme Verlag, Seite 151-167
- (104) Lüllman-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie 10. Oktober 2012, Thieme Verlag
- (105) Lumachi F, Ermani M, Camozzi V, Tombolan V, Luisetto G. Changes of bone formation markers osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in postmenopausal women with osteoporosis. 2009; *Annals of the New York*

- Academy of Sciences. 1173 Suppl 1: E60–3. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04953.x. PMID 19751416.
- (106) Mai CM. Bioaktive Granulate in der Unfallchirurgie, Experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung. 2003; VNM Science Publishing
- (107) Mandelkow HK, Hallfeldt KK, Kessler SB, Gayk M, Siebeck M, Schweiberer L. New bone formation following implantation of various hydroxyapatite ceramics. Animal experiment with bore hole models of the sheep tibia. Unfallchirurg. 1990 Aug;93(8):376-9
- (108) Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Giardino R, Rocca M, Corsi A, Benvenuti A, Bianco P, Quarto R, Martin I, Muraglia A, Cancedda R. Reconstruction of Extensive Long-Bone Defects in Sheep Using Porous Hydroxyapatite Sponges. Calcified Tissue International, 1999; Volume 64, Issue 1, pp 83-90
- (109) Meffert O, Kämmerer H. Das Fluoreszenzverhalten von Tetracyclin-Depots in Knochen und Zähnen. In: Langenbecks Archiv für Chirurgie, 1970; Volume 327, Issue 1, pp 254-258
- (110) Mekraldi S, Lafage-Proust MH, Bloomfield S, Alexandre C, Vico L. Changes in vasoactive factors associated with altered vessel morphology in the tibial metaphysis during ovariectomy-induced bone loss in rats. Bone. 2003; 32(6):630-41.
- (111) Mirzasadeghi A, Narayanan SS, Ng MH, Sanaei R, Cheng CH, Bajuri MY, Shukur MH. Intramedullary cement osteosynthesis (IMCO): a pilot study in sheep. Biomed Mater Eng. 2014; 24(6):2177-86.
- (112) Mulhard C. Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics Experimentator 2009, pp 121-138 Kapitel: RNA, Spektrum Akademischer Verlag
- (113) Müller M. Chirurgie. 10. Auflage, 2011, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach
- (114) Müller- Mai C. Bioaktive Granulate in der Unfallchirurgie: experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung. 2003
- (115) Münzenberg KJ, Gebhardt M. Tetracyclin und Knochenkollagen. Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie, mit besonderer Berücksichtigung der Frakturenlehre und der orthopädisch-chirurgischen Technik, 1970; Volume 67, Issue 3, pp 211-216
- (116) Murugan R, Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. Comp Sci Tech; 2005; 65:2385–2406
- (117) Muschik M, Ludwig R, Halbhübner S, Bursche K, Stoll T. β -tricalcium phosphate as a bone substitute for dorsal spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis:

- preliminary results of a prospective clinical study, *European Spine Journal*, October 2001; Volume 10, Issue 2 Supplement, pp S178-S184
- (118) Muschler GF, Lane JM. Bonegrafts and bone substitutes. 1992; *Orthopedic surgery*. In: Habal MB, Reddi AH (eds). Saunders, Philadelphia, pp 375–407
- (119) Muttini A, Abate M, Bernabò N, Cavani F, Mingozi R, Tosi U, Cadossi M, Setti S, Giannini S, Leone R, Valbonetti L. Effect of electric current stimulation in combination with external fixator on bone healing in a sheep fracture model. *Veterinaria Italiana* 2014, 50 (4), 249-25
- (120) Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. *Orthopädie und Unfallchirurgie. Duale Reihe*, 7. Auflage, 2014; Thieme Verlag Stuttgart
- (121) Nihouannen D, Saffarzadeh A, Gauthier O, Moreau F, Pilet P, Spaethe R, Layrolle P, Daculsi G. Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, February 2008, Volume 19, Issue 2, pp 667-675
- (122) Norbert U. *Histologie: das Stützgewebe Knorpel und Knochen*; 2011; Thieme, pp 43-48
- (123) Offermann S. *Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology, Bone Remodelling*; 2004; p 197, Springer Verlag
- (124) Offermann S. *Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology, Osteoblast*, 2004; p702, Springer Verlag
- (125) Olivares-Navarrete R, Gittens RA, Schneider JM, Hyzy SL, Haithcock DA, Ullrich PF, Schwartz Z, Boyan BD. Osteoblasts exhibit a more differentiated phenotype and increased bone morphogenetic protein production on titanium alloy substrates than on poly-ether-ether-ketone. *Spine J.* Mar 2012; 12(3): 265–272
- (126) Ollier L. *Traité expérimental et Clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux*. 1867; Victor Masson et Fils, Paris
- (127) Oryan A, Soodeh A, Moshiri A, Bigham-Sadegh A, Bone morphogenetic proteins: A powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations, Volume 40, Issue 5, 2014 *BIO Factors*
- (128) Pape HD, Gerlach KL, Steegmann G, Krause HR. *Klinische Studie zur Kieferkammrekonstruktion mit dem Knochenersatzmaterial Hydroxylapatit, Plastische und Wiederherstellungschirurgie des Alters*, Volume 23 of the series *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie*, 1985; Köln pp 203-210
- (129) Patchell RA, Tibbs PA, Regine WF, Payne R, Saris S, Kryscio RJ, Mohiuddin M, Byron Y. Improvement in quality of life after surgery for spinal metastasis. *Direct*

- decompressive surgical resection in the treatment of spinal cord compression caused by metastatic cancer: a randomised trial; *Lancet* 2005 Aug 20-26; 366 (9486):643-8
- (130) Pavelka M, Roth J. Funktionelle Ultrastruktur, Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben, Kapitel: Osteoblast und Osteozyt, Funktionelle Ultrastruktur, 2005, Springer Wien, New York
- (131) Peest D, Coldewey R, Deicher H, Sailer M, Vykoupil C, Leo R, Georgii A, Karow J, Hoepfner E, Diehl V. Prognostic value of clinical, laboratory, and histological Characteristics in multiple myeloma: improved definition of risk groups. 1993; *Eur. J. Cancer* 29a, 978-983,
- (132) Peled, A, Zipori D, Abramsky O, Ovadia H, Shezen E. Expression of a-smooth muscle actin in murine bonemarrow stromal cells. *Blood* 78: 304–309, 1991 From www.bloodjournal.org by guest on August 31, 2015
- (133) Peters KM, König DP. Fortbildung Osteologie 1. Steinkopf Verlag Darmstadt, pp 43-45, 2006
- (134) Pickford M, Turner AD. Metallische Implantate; <http://www.patent-de.com/20060713/DE60302447T2.html>; 18.03.2016
- (135) Pilge H, Holzapfel BM, Prodinger PM, Hadjamu M, Gollwitzer H. Rechl H. Klinik Und Poliklinik Für Orthopädie Und Unfallchirurgie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München. *Orthopäde* 2011; 40:185–196
- (136) Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. 2009; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (3): 827–32. doi:10.1210/jc.2008-1422. PMC 2681283. PMID 19088165
- (137) Ploska U Berger Georg. A New Procedure of a Calcium-Containing Coating on; 2003
- (138) Pohl, M. Elektropolieren und Mikrostrukturieren metallischer Werkstoffe; 2004; Institut für Werkstoffe, Ruhr-Universität Bochum
- (139) Poon B, Kha T, Tran S, Dass CR. Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls, Volume 68, Issue 2, 2016, Pages 139–147 *JPP Journal of Pharmacy and Pharmacology*
- (140) Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol.* 1999; 277(2 Pt 1):C183-201. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* Published 1 August 1999 Vol. 277 no. 2

- (141) Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 1999; Vol. 277 no. 1
- (142) Predecki P, Stephan JE, Auslaender BA, Mooney VL, Kirkland K. Kinetics of bone growth into cylindrical channels in aluminum oxide and titanium. *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 6, Issue 5, pages 375–400, September 1972
- (143) Qu S, Fan H, Chen J, Feng J, Fu R, Wei D, Zhanget X. Effect of the crystallinity of calcium phosphate ceramics on osteoblast proliferation in vitro. *Journal of Materials Science Letters*, 2001; Volume 20, Issue 4, pp 331-332
- (144) Rammelt S, Schulze E, Witt M, Petsch E, Holch M, Pompe W, Zwipp H. Kollagen-modifizierte Hydroxylapatit-Implantate führen zu einem erhöhten Knochenremodeling in der Rattentibia. *Chirurgisches Forum* 2002; Volume 31 of the series Deutsche Gesellschaft für Chirurgie pp 411-413
- (145) Rehman I, Smith R, Hench LL, Bonfield W. Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite. FT-Raman spectroscopy. *J Biomed Mater Res* 1995; 29(10):1287-1294.
- (146) Reif K. Untersuchung des Knochenstoffwechsels anhand der Knochenmarker knochenspezifische alkalische Phosphatase und Pyridinolin am intakten und ovariohysterektomierten Osteoporosemodell Minipig. 2007
- (147) Reinhold FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. 1990; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (12): 4473–5
- (148) Reinle T. Untersuchungen zur Biokompatibilität eines Antibiotikumträgers aus Kalziumsulfat und nanopartikulärem Hydroxylapatit und zur Pharmakokinetik von Gentamicin, Vancomycin und Clindamycin nach Implantation in Kaninchenfemura. 2005
- (149) Rentsch C, Rentsch B, Scharnweber D, Zwipp H, Rammelt S. Knochenersatz Transplantate und Ersatzmaterialien – ein Update, *Unfallchirurg* 2012, 115:938–949
- (150) Ribeiro FO. In silico mechano-chemical model of bone healing for the regeneration of critical defects: the effect of BMP-2. *PLoS ONE* 2015; 10: e0127722.
- (151) Robioneck P. Einfluss der ultraschallgestützten Implantatfixation auf das Knochenremodelling im experimentellen Osteotomiemodell am Femurcondylus des Kaninchens. 2010

- (152) Rosalbino F, Delsante S, Borzone G, Scavino G. Influence of noble metals alloying additions on the corrosion behaviour of titanium in a fluoride-containing environment. *J Mater Sci Mater Med*. 2012; 23(5):1129-37
- (153) Roshan J, Meng D, Cato L, Sangamesh K, Nanocomposites and bone regeneration, *Frontiers of Material Science*, 2011, 5(4): 342–357)
- (154) Rovenský J, Payer J. Osteomyelitis. In: *Dictionary of Rheumatology*. 2009; Springer Verlag Wien, pp 157-158
- (155) Rudy T, Dresing K, Urbach J, Stürmer KM. Wächst der Knochen in definierte Porenkanäle von Implantaten aus Titan besser ein als in Aluminiumoxid? *Chirurgisches Forum* 2002; *Deutsche Gesellschaft für Chirurgie Volume 31*, 2002, pp 407-409
- (156) Rueger JM, Hägele J, Lehmann W, Rücker A, Schlickewei C. Knochenaufbau – Knochenersatzmaterialien Teil 2; 2010; *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*, Heft 5, pp 315-332
- (157) Rueger JM, Hägele J, Lehmann W, Rücker A, Schlickewei C. Knochenaufbau – Knochenersatzmaterialien, Teil 1, *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 2010; 5(5): 295-314, DOI: 10.1055/s-0030-1255793
- (158) Sailer HF, Weber FE. *Knochenersatzmaterialien*, 2000
- (159) Saito E, Suarez-Gonzalez D, Murphy WL, Hollister SJ. Biomaterial Coating Increases Bone Formation by Ex Vivo BMP-7 Gene Therapy in Rapid Prototyped Poly (l-lactic acid) (PLLA) and Poly(ε-caprolactone) (PCL) Porous Scaffolds. *Adv Healthc Mater*. 2014
- (160) Sapir-Koren R, Livshits G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles?, 2014; *Osteoporosis*,
- (161) Schenk RK. Bone response to grafts and implants, in *Perspectives on biomaterials. Materials science monographs*, Lin O.C.C., Chao E.Y.S. (eds.), Elsevier, Taipei, Taiwan, 1986, p. 121–136
- (162) Scherzed A. *Tissue Engineering -Kultivierung verschiedener Progenitorzellen mit mesenchymalen Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien in vitro*, ,2009
- (163) Schiebler TH, Korf HW. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, 2007
- (164) Schieker M, Heiss C, Mutschler W. *Knochenersatzmaterialien*. 2008; *Der Unfallchirurg*, Volume 111, Issue 8, pp 613-620
- (165) Schieker M, Heiss C, Mutschler W. *Knochenersatzmaterialien. Unfallchirurg* 2008 · 111:613–620, DOI 10.1007/s00113-008-1489-6, Springer Medizin Verlag

- (166) Schild TA, 7700 SDS Workshop, Einführung in die Real-Time TaqMan^a PCR-Technologie, Vers. 2.1, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, 23.08.2015
- (167) Schlottig F. Implantatoberflächen – Stand der Technik. ZMK, Ausgabe 6, 2010; 26. Jahrgang
- (168) Schmidmaier G, Wildemann B, Schwabe P, Stange R, Südkamp NP, Raschke M. Steigerung der Implantateinheilung durch eine gradierte Hydroxylapatit-Beschichtung von Implantaten. Chirurgisches Forum 2002; Volume 31 of the series Deutsche Gesellschaft für Chirurgie pp 445-447
- (169) Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg). Physiologie des Menschen, 30. Auflage, 2007; Springer Verlag, Heidelberg
- (170) Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. Am J Pathol. 1991; 138(5): 1233–1242
- (171) Schneiders W, Reinstorf A, Biewener A. In vivo effects of modification of hydroxyapatite/collagen composites with and without chondroitin sulphate on bone remodeling in the sheep tibia. 2009; J Orthop Res 27(1):15–21
- (172) Schnettler R, Alt V, Dingeldein E, Pfefferle HJ, Kilian O, Meyer C, Heiss C, Wenisch S. Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. Biomaterials 2003; 24 (25): 4603-4608
- (173) Schnettler R, Alt V, Stahl JP, Wenisch S. Cellular Aspects of Bone Defect Healing After Implantation of Calcium Phosphate-Based Bone Substitutes. In: Practice of Intramedullary Locked Nails. New Developments in Techniques and Applications. Editors-in-chief: Leung KS, Taglang G, Schnettler R, Alt V, Haarman HJThM, Seidel H. (Eds.). 2006. Springer, Heidelberg, S. 7-22.
- (174) Schnettler R, Dingeldein E, Tausch W. Untersuchungen zur knöchernen Integration einer Hydroxylapatit-Keramik und bFGF im Vergleich zu autogenen Spongiosazylindern., 1994; Osteo Trauma Care, 2:118-126 In: Schnettler R, Markgraf E, editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997: 31-42.
- (175) Schnettler R, Stahl J, Alt V, Pavlidis T, Dingeldein E, Wenisch S. Calcium Phosphate-Based Bone Substitutes, European Journal of Trauma, 2004; Volume 30, Issue 4, pp 219-229
- (176) Schnürer SM, Gopp U, Kühn KD. Knochenersatzwerkstoffe. 2003; Orthopade 32(1):2–10
- (177) Schoenenberger RA, Haefeli WE, Schifferli J. Internistische Notfälle. 2008; Thieme Verlag, p 274,

- (178) Schröder M. Der Experimentator: Gentechnische Methoden, 2012, pp 233-260, Isolierung und Markierung von RNA, Spektrum Akademischer Verlag
- (179) Schuh A, Thomas P, Kachler W, Göske J, Wagner L, Ho Lzwarth U, Forst R. Das Allergiepotezial von Implantatwerkstoffen auf Titanbasis. 2005; Orthopäde 34:327-333
- (180) Schüttrumpf JP. Einfluss von autologem Platelet-Rich-Plasma auf dieOsteogenese nach Implantation eines Calciumphosphatbasierten Knochenersatzmaterials (Calcibon® Granules) Tierexperimentelle Untersuchungen am Bohrlochmodell des Schafes. 2010
- (181) Schwenzer N, Ehrenfeld M. Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde: Zahnärztliche Chirurgie. 2000; Thieme Verlag, Seite 212-225
- (182) Sheng L, Ke X, Jin Z. The biological function of osteocytes, 2014; 45 (2):100-4
- (183) Siebert HR, Wagner K, Rueger JM. Biologische Wertigkeit verschiedener Knochenersatzmittel in der Behandlung von Knochendefekten, Tierexperimentelle Untersuchungen. Unfallchirurgie 12, 1986; 98-100 (Nr. 2)
- (184) Siewert JR, Brauer RB. Basiswissen Chirurgie. 2010; Springer Verlag, p 465
- (185) Skorupa AB. Histologische Biokompatibilitätsprüfungen eines bioresorbierbaren Dreikomponenten-Knochenklebstoffes auf β -Tricalcium-Phosphat-Basis, Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung am Kaninchen. 2009
- (186) Smeets R. Osteokonduktive und -induktive Knochenersatzmaterialien – Teil 2. 2010
- (187) Smeets R, Hanken H, Jung O, Rothamel D, Handschel J, Al-Dam A, Blessmann M, Heiland M, Kolk A. Knochenersatzmaterialien – Aktueller Stand und ein Ausblick in die Zukunft. MKG-Chirurg 2014;7:53–67
- (188) Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect; 2012; Nat Protoc:7(10):1918-29.
- (189) Spiegel HU, Krukemeyer MG. Chirurgische Forschung, Stuttgart:Thieme, p 418
- (190) Spivak JM, Hasharon A. Use of hydroxyapatite in spine surgery. European Spine Journal, October 2001; Volume 10, Issue 2 Supplement, pp S197-S204
- (191) Stein V, Lubinuset P. Die SP2 Schaft Endoprothese, 2015; Seite 125- 128, http://www.implantat-atlas.com/pdf/huftschaft_e_inhalt.pdf, 22.06.15
- (192) Strauß S, Neumeister A, Barcikowski S, Kracht D, Kuhbier JW, Radtke C, Reimers K, Vogt PM, Engler AJ. Adhesion, Vitality and Osteogenic Differentiation Capacity of Adipose Derived Stem Cells Seeded on Nitinol Nanoparticle Coatings. PLoS One. 2013; 8(1): e53309.

- (193) Stürmer K. Die elastische Plattenosteosynthese, ihre Biomechanik, Indikation und Technik im Vergleich zur rigiden Osteosynthese, Unfallchirurg 1996; 99:816–829 Springer-Verlag
- (194) Stürmer K. Experimentelle Arbeiten: Histologische Befunde der Frakturheilung unter Fixateur externe und ihre klinische Bedeutung, Unfallchirurgie 10 (1984), 110-122 (Nr. 3)
- (195) Sultana R , Kon M, Hirakata Lm, Fujihara2 E, Asaoka K, Ichikawa T. Surface Modification of Titanium with Hydrothermal Treatment at High Pressure, 2006; Dental Materials Journal 25 (3) : 470–479
- (196) Sutherland D, Bostrom M. Bone regeneration and repair: Graft and bone graft substitutes, 2005, pp 133-156
- (197) Tapp E. Tetracycline labelling methods of measuring the growth of bones in the rat. 1970; pp: 1-9
- (198) Tauchnitz C, Miksits K. Osteomyelitis Steckbrief, In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 2005; Springer Berlin Heidelberg pp 963-966
- (199) Teschner M, Küsswetter W. Gentechnisch induziertes Knochenwachstum. Dtsch Arztebl 1999; 96(28-29): A-1891 / B-1591 / C-1411
- (200) Texhammar R, Coton C. AO-Instrumente und – Implantate. 1994;Seite 50-52, Springer
- (201) Texhammer R, Colton CL. AO/ASIF instruments and implants: a technical manual. Berlin : Springer-Verlag, 1994, pp 471-481
- (202) Trentz O, Transplantation von Knochen bei aseptischen traumatischen und posttraumatischen Zuständen, 1986; Orthopäde 15: 36–41
- (203) Tscherne H, Regel G. Knochenersatz Aktueller Stand und Perspektiven. 1996 Teil II Allgemeine Behandlungsgebiete
- (204) Tscherne H, Regel G. Knochenersatz Aktueller Stand und Perspektiven. 1996; Teil II Allg. Behandlungsgebiete, J Mater Sci: Mater Med DOI 10.1007/s10856-014-5240-2, 2014
- (205) Tyliczczaka B, Gacaa KZ, Sobczak-Kupiecb A, Dulianba P. Mechanochemical synthesis and investigations of calcium titanate powdersand their acrylic dispersions. Journal of the European Ceramic Society, 2014; 34(10):2259–2264
- (206) Villalpando-Reyna A, Cortés-Hernández DA, Gorokhovskiy A, Almanza-Robles JM, Escobedo-Bocardo JC. In vitro bioactivity assessment and mechanical properties of novel calcium titanate/borosilicate glass composites. Ceramics International Volume 37, Issue 5, 2011. Pages 1625–1629

- (207) Vuolteenaho K, Moilanen T, Moilanen E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol* 102(1): 10-14, 2008
- (208) Walter G, Kemmerer M, Kappler C, Hoffmann R. Treatment Algorithms for Chronic Osteomyelitis. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109(14): 257-64; DOI: 10.3238/arztebl.2012.0257
- (209) Wei D, Yu Zhou Y, Jia D, Wang Y. Structure of calcium titanate/titania bioceramic composite coatings on titanium alloy and apatite deposition on their surfaces in a simulated body fluid. 2007; *Surface and Coatings Technology*, 201(21):8715-8722
- (210) Weiner S, Wagner HD. The material Bone: structure-mechanical function relations. 1998; *Annu Rev. of Mater. Sci.* 28:271-98
- (211) Wenisch S, Kraus R, Sommer U, Pautzsch T, Schnabelrauch M, Peters F, Hübner WD, Kilian O, Schnettler R, Heiss C. Morphological investigations into biocompatibility of beta-tricalciumphosphate-based bone adhesives in a rabbit model. 2009; *Z Orthop Unfall*
- (212) Wenisch S, Stahl JP, Horas U, Kilian O, Heiss C, Schnettler R. Ultrastrukturelle Untersuchungen zum zellvermittelten Abbau einer Calciumphosphatkeramik, *Unfallchirurg* 2003; 106:387–391 DOI 10.1007/s00113-003-0578-9
- (213) Wenisch S, Stahl JP, Horas U, Kilian O, Heiss C, Schnettler R. Ultrastrukturelle Untersuchungen zum zellvermittelten Abbau einer Calciumphosphatkeramik, Eine experimentelle Studie am Schaf. *Unfallchirurg* 2003; 106:387–391
- (214) Wieghorst N. Morphologische Untersuchung zum zellvermittelten Abbau und zur knöchernen Integration von resorbierbarem Calcium- Phosphat (Biobon®) im Tibiabohrlochdefekt beim Schaf. 2006
- (215) Willert HG, Brobäck LG, Buchhorn GH, Jensen PH, Köster G, Lang I, Ochsner P, Schenk R. Crevice corrosion of cemented titanium alloy stems in total hip replacements. 1996; *Clin Orthop* 333:51–75
- (216) Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G. Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte zur Unfallheilkunde*, 1990; Heft 212; 479-488
- (217) Wolf B, Buckwalter JA. Randomized Surgical Trials and "Sham" Surgery: Relevance to Modern Orthopaedics and Minimally Invasive Surgery, *Iowa Orthop J.* 2006; 26: 107–111.
- (218) Zétola A, Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in the treatment of mandibular sequelae after tumor resection. *Oral Maxillofac Surg* 2010; 15: 169–174

- (219) Zhanghua L, Repair of sheep metatarsus defects by using tissue-engineering technique, February 2005, Volume 25, Issue 1, pp 62-67, Journal of Huazhong University of Science and Technology, Medical Sciences

7. Danksagung

Danken möchte ich Herrn **Univ.-Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler** für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Betreuung als Doktorvater und die Nutzung des Labors für experimentelle Unfallchirurgie.


Weiter möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Laboratoriums für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität in Gießen bedanken, die mir bei Problemen und Rückfragen jeglicher Art stets hilfreich zur Seite gestanden haben und mich bei vielen Aufgaben tatkräftig unterstützten. Danke auch an Frau **Ida Oberst**. Insbesondere gilt mein Dank Frau **Dr. Ursula Sommer** für ihre engagierte Hilfe als Betreuerin der Dissertationsarbeit, die mich mit ihrer Expertise, konstruktiver Kritik und Motivation rege unterstützt hat.

Schließlich danke ich meiner Familie, besonders meiner Mutter **Christel**, die mich ermutigte, Medizin zu studieren, sowie **Eugenio und Stéphanie de Azevedo**, **Doris und Walter Stahl**, meinem Ehemann **Michael de Azevedo** und meiner kleinen **Samtpfote Chipsy**, die stets an mich geglaubt und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

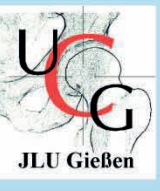
9. Publikationen



Experimentelle Untersuchung zur Biokompatibilität offenerporiger metallischer Implantatstrukturen mit bioaktiver Calcium-Titanat-Reaktionsschicht unter besonderer Berücksichtigung des Knochenaufbaus

de Azevedo L.^{1,2}, Sommer U.², Thormann U.^{1,2}, Hagemann K.³, Bührig-Polaczek A.³, Guillén T.⁴, Ohrndorf A.⁴, Christ H.-J.⁴, Ploska U.⁵, Becker A.⁵, Altindis M.⁶, Berger G.⁵, Krupp U.⁶, Wenisch S.⁷, Schnettler R.¹



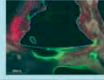




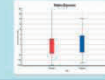
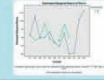
¹ Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Gießen; Klinikstraße 33, 35392 Gießen, lucie.de-azevedo@med.uni-giessen.de;
² Labor für experimentelle Unfallchirurgie Gießen, Veterinärmedizin, Gießen; ³ RWTH Aachen, Gießerei-Institut, Aachen; ⁴ Universität Siegen, Institut für Werkstofftechnik, Siegen; ⁵ Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin; ⁶ Fachhochschule Osnabrück, Fakultät für Ingenieurwissenschaften und Informatik, Osnabrück; ⁷ Justus-Liebig-Universität Gießen, Klinische Anatomie und experimentelle Chirurgie, Gießen



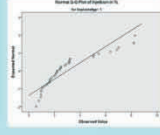



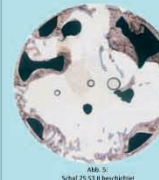
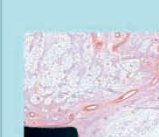
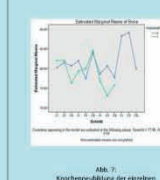

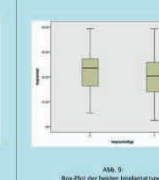
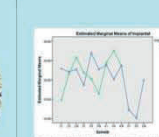
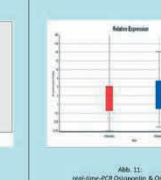

Motivation und Zielstellung

Im vorliegenden, von der DFG geförderten Forschungsprojekt wurde der Einfluss der Funktionalisierung einer gegossenen, offenerporigen Titanlegierung der Größe von 10mm im Durchmesser und 10mm Länge mit einer Calcium-Titanat-Reaktionsschicht im Langzeitversuch am Grolfiter (Merino-Wollschaf, 71-87kg KGW, 3,5-7 Jahre) untersucht, unter besonderer Berücksichtigung der knöchernen Integration des Materials sowie der osteoblastischen Aktivität. Ziel der Arbeit war es, durch die Funktionalisierung mittels einer biologischen Reaktionsschicht eine Zellinvasion von knochenbauenden Zellen (Osteoblasten) und dadurch eine schnellere Defektheilung im ovinen Knochen anzuregen. Dies sollte später bei Patienten mit systemischen Knochenkrankungen, wie z.B. dem Plasmazytom, zum Einsatz kommen, so dass zukünftig dem rekonstruktiv tätigen Chirurgen eine Auswahl an beschichteten Implantaten zur Verfügung stünden, um den Knochendefekt stabilisierend zu substituieren. Von besonderem Interesse war hierbei die Grenzflächenreaktion zwischen Osteoblasten und der Calcium-Titanat-Reaktionsschicht.

Experimentelle Methodik

Implantat-Herstellung	Im- und Explantation (nach 6 Monaten Standzeit)	in-vivo-polychrome Sequenz-Markierung	Schliff-Herstellung (Ø 17 Schiffe pro Tier)	Färbung mit Toluidinblau	Alkalische Phosphatase	Immunhistochemie (ASMA)	real-time-PCR	Histomorphometrie
								

Ergebnisse

<h4>1. Polychrome Sequenz-Markierung</h4>  <p>Abb. 1: Q-Phi vs Implantation %</p> <p>„Injektion in %“ ist der prozentuale Anteil an reimplantierten Knochen nach der Kollagen-Label über einen Standzeit von drei Monaten (Implantation am Tag 98 / 106 post operationem). Der Median beträgt nach histomorphometrischer Auswertung für das Fluoreszenz bei der Untersuchung (D) 1,935% und für die beschichteten (S) 2,230%.</p>  <p>Abb. 2: Schaf 25/4 II beschichtet</p> <p>Histomorphometrische Auswertung der Alkalischen Phosphatase (mit Fluoreszenz-Label) zeigt bei beiden Gruppen (S) und (D) eine gleichmäßige Verteilung der Alkalischen Phosphatase.</p>	<h4>2. Alkalische Phosphatase</h4>  <p>Abb. 3: Schaf 11/12 II beschichtet</p> <p>Der Nachweis der alkalischen Phosphatase zeigt die osteoblastische Aktivität an. Der Mittelwert der Enzymaktivität liegt bei den beschichteten Implantaten mit 2,77% deutlich höher (bei den nicht-funktionierten Implantaten 1,97%).</p>  <p>Abb. 4: Schaf 25/4 II beschichtet</p> <p>Für die Histomorphometrie wurde die nachgewiesene alkalische Phosphatase-Aktivität mit Phosphor-markiert, gemessen und blau eingefärbt.</p>	<h4>3. Toluidinblau-Färbung und ASMA</h4>  <p>Abb. 5: Schaf 25/3 II beschichtet</p> <p>Im Rahmen der Toluidinblau-Färbung konnte ebenfalls ein verändertes Knochenverhalten für die Knochenneubildung erkannt werden: Funktionierte Implantate 30,64% im Gegensatz zu den neuen Titan-Implantaten mit 24,73 %.</p>  <p>Abb. 6: Schaf 25/3 II beschichtet</p> <p>Der immunhistochemische Nachweis von Anti-Smooth-Muscle-Aktin (ASMA) zeigt zwei verschiedene Reaktionen im Defektbereich nach jedoch keine zwischen den beiden Gruppen kein morphologischer Unterschied festgestellt werden.</p>	<h4>4. Knochenneubildung</h4>  <p>Abb. 7: Knochenneubildung der einzelnen Knochenstücke</p> <p>Diese Grafik verdeutlicht die Knochenneubildung im Defektbereich unter Berücksichtigung der einzelnen Knochenstücke. Der Mittelwert für „Beschichtet“ (S) lag im gesamten Defektbereich bei 85,37% (mit „unbeschichtet“ (D) bei 79,23% ein).</p>  <p>Abb. 8: Schaf 12/4 II unbeschichtet</p> <p>Der reimplantierte Knochen wurde hier in einem beschichteten Implantat während der histomorphometrischen Auswertung mit Phosphor markiert, gemessen und orangegefärbt übergeben.</p>	<h4>5. Implantattyp</h4>  <p>Abb. 9: Box-Plot der beiden Implantattypen</p> <p>Die Auswertung einzelner histomorphometrischer Messungen der Knochenneubildung zeigt, dass bei den funktionierten Implantaten eine große Ergebnissteigerung innerhalb der Gruppe, jedoch keine implantatbezogene Divergenz.</p>  <p>Abb. 10: Implantattypen im Vergleich bei allen Ergebnissen</p> <p>Abbildung 10 zeigt beide Implantattypen bei dem Vergleich sämtlicher Ergebnisse. In Bezug zur Knochenneubildung, der Art der Implantat, im planarischen und des Fluoreszenz-Labels in Berücksichtigung der einzelnen Knochenstücke. Bei beiden Versuchsgruppen zeigte sich eine gleiche Verteilung beider Implantate.</p>	<h4>6. real-time-PCR</h4>  <p>Abb. 11: real-time-PCR Osteopontin & Osteocalcin</p> <p>Osteopontin und Osteocalcin sind Strukturproteine der Knochenmatrix und werden von Osteoblasten - also knochenbauenden Zellen - exprimiert und funktionieren somit als ein indirekter Aktivitätsmarker für diese.</p>  <p>Abb. 12: Ergebnisse der real-time-PCR</p> <p>Die real-time-PCR ergab eine große Ergebnissteigerung bei Osteopontin und Osteocalcin innerhalb der beiden Gruppen (Gruppengröße jeweils 5 Tiere). Beide Proteine sind bei den funktionierten Implantaten leicht hochgezeigt.</p>
---	---	--	---	--	--

Diskussion

Vergleicht man die Ergebnisse der beschichteten und unbeschichteten Implantate, so zeigt sich, dass die Menge des neugebildeten Knochens bei den BESCHICHTETEN Implantaten sowohl bei der histomorphometrischen Messung, der Aktivität der alkalischen Phosphatase, der Toluidinblau-Färbung und den Fluoreszenzen MINIMAL, jedoch nicht signifikant HÖHER ist. Weiterhin ist ersichtlich, dass sich die Knochenneubildung vornehmlich auf die Randbereiche des Implantates konzentriert, während das Innere des Defektes weitgehend knochenfrei bleibt. Es ließ sich bei vielen Präparaten eine Spaltbildung zwischen Implantataußenfläche und benachbartem Knochen finden. Dies lässt folgende Überlegungen zu:

- Jedes Implantat wurde in der Drehmaschine zu einem zylindrischen Rotationskörper geformt, um später press-fit in den Defekt des Diamond-Bone-Cutting-Systems zu passen. Um die lückenlose Bildung der Reaktionsschicht zu gewährleisten, mussten die gegossenen Implantate vorab mit Fluss- und Salpetersäure angeätzt werden, wobei der Ätzvorgang an der gedrehten äußeren Oberfläche der Implantate weniger effektiv war als im Inneren und die Oberfläche hier somit „glatter“ ausgefallen ist. Dies scheint zu einer erniedrigten Zelladhäsion im Bereich der gedrehten, äußeren Oberfläche geführt zu haben.
- Die ursprünglich geplanten 20-30ppi dichten, spongiosa-ähnlichen Strukturen konnten mithilfe des Gießvorgangs nicht realisiert werden, was in größeren Implantaten als vorgesehen resultierte.
- Titanlegierungen haben ein höheres E-Modul (55-116 GPa) als spongioser Knochen (14-22 GPa); damit wird die Belastung auf die Gliedmaßen vom Implantat abgefangen, sodass der Knochen keine mechanische Veranlassung sieht, in den durch das Implantat stabilisierten Defekt einzuwachsen.
- Durch individuelle anatomische Differenzen (altersbedingt, kongenitale Fehlbildungen mit verändertem Q-Winkel) konnte nicht bei allen rechten medialen ovinen Femurkondylen der exakt gleiche Implantationsort gewährleistet werden, so dass das Implantat nicht immer im idealen Verhältnis zum Kraftvektor, im Sinne eines Anreizes zur Knochenneubildung, vorlag.

Zusammenfassung

- Zwölf adulten Merino-Landschafen wurden zylindrische, 10mm x 10mm große Titankörper (Ti-6Al-7Nb) in einen Defekt der rechten medialen Femurkondyle implantiert. Die Hälfte der Implantate wurde vorab mit einer Calcium-Titanat-Reaktionsschicht funktionalisiert.
- Während der Standzeit bekamen die Tiere zu drei verschiedenen Zeitpunkten (polychrome Sequenzmarkierung jeweils post-operationem) Fluorochrome: Tag 28/ 35 Tetracyclin, Tag 98/105 Alizarin und Tag 168/175 Calcein.
- Sechs Monate nach der Implantation wurden die Tiere euthanasiert, die Femurkondylen entnommen, in Technovit®9100neu eingebettet und schließlich Knochenschiffe hergestellt. Diese dienten als Grundlage für die nachfolgenden Fluoreszenzmikroskopischen, standardhistologischen, enzym- und immunhistochemischen sowie histomorphometrischen Auswertungen der Knochenmenge, der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Darstellung der Blutgefäße im Defektbereich mittels ASMA.
- Weiterhin wurde mittels real-time-PCR die relative Expression von Osteopontin und Osteocalcin bestimmt.
- Sämtliche Ergebnisse ergeben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Implantaten.
- Somit hat die Funktionalisierung der Titanlegierung mit Calcium-Titanat-Reaktionsschicht keinerlei Einfluss auf die Knochenheilung der Titan-Implantate.

Dankagung: Diese Arbeit wurde finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG

A brief "brain-twinkle" while reading

L. de Azevedo^{1,2}, D. Carrierio¹, D. Bahner¹, M. Horn¹

¹ Klinik für Neurologie, Klinikum Bad Hersfeld, ² Justus-Liebig-Universität Gießen
Kontakt: lucie.de-azevedo@med.uni-giessen.de



Fig. 1: Binocular hematoma after a first generalized tonic-clonic seizure

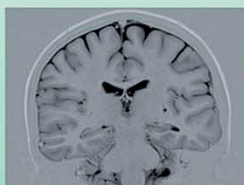


Fig. 2: MRI (inversion recovery sequence). Absence of hippocampal sclerosis or migration disorder

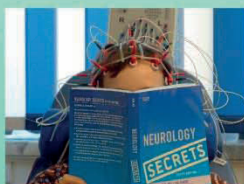


Fig. 3: After 3 min reading silently, the patient reported perioral paresthesia

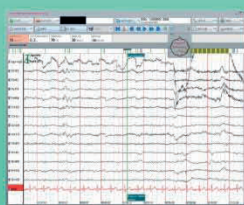


Fig. 4: After 5 min reading silently, a single paroxysm of generalized spike-wave-complexes was recorded and jaw jerks occurred

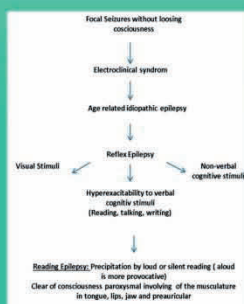


Fig. 5: ILAE-classification of age-related idiopathic epilepsy

Background

The overall incidence of reflex epilepsy syndromes is very low, whereas especially reading epilepsy represents a rarity and a frequently misdiagnosed disorder. The number of reported patients suffering from reading epilepsy remains within the three digit range worldwide.

Case Report

A 26-year-old Caucasian woman was admitted to our department after a first generalized tonic-clonic seizure (GTCS). She reported initial perioral paresthesia while reading immediately before she lost consciousness. Medical history revealed that since the age of 17, the patient had experienced attacks of prickling perioral paresthesias which develop exclusively and reproducibly after reading several minutes silently or aloud, respectively, accompanied by short disturbances of consciousness. The patient herself described these symptoms as "a short brain-twinkle". The disorder had formerly been diagnosed as an anxiety disorder and was treated with benzodiazepines. Family history excluded a hereditary epileptic disorder.

Clinical and technical findings

Clinical-neurological examination did not discover any focal neurological symptoms. A binocular hematoma and a mild concussion implied that the patient had fallen without adverse-effects reflexes (Fig. 1). Brain-MRI (Fig. 2), standard EEG and sleep-deprived EEG did not reveal pathological findings. In a reading-provoked EEG, centro-frontally emphasized patterns, suspicious for epileptic discharges, were recorded, accompanied by perioral sensations (Fig. 3). Finally, after 3, 5, and 7 minutes of reading, respectively, jaw jerks and a single paroxysm of generalized spike-wave-complexes with emphasis of the centro-frontal region occurred (Fig. 4).

Diagnosis

The current disorder was regarded as an idiopathic reading epilepsy. Treatment with lamotrigine was successful in preventing further seizures over a follow-up of six months and was tolerated without side-effects. The patient, who had cancelled secondary school at the age of 18, now was able to catch up high school diploma in evening classes and is going to become a first semester student at a teachers college.

Discussion

According to the International League against Epilepsy (ILAE 2010), reflex epilepsy represents an age-related idiopathic epilepsy and is characterized by seizures which are reproducibly triggered by specific excitation (Fig. 5). Subtypes of reflex epilepsy are the Noogene-epilepsy, epilepsy induced to practice, arithmetic epilepsy and reading epilepsy, respectively (Wolf 1994). Idiopathic epilepsies account for 30 to 40 percent of all epileptic disorders in childhood and for 20 percent in adult age (Steinlein, 1999).

Originally described by Bickford and colleagues in 1956, reading epilepsy still represents a rare and frequently misdiagnosed disorder clinically characterized by an invariable semiology: after a certain time of loud or silent reading, respectively, and being fully conscious patients develop miscellaneous sensations such as perioral numbness, tingling or increased muscle tone and myoclonic jerks mainly restricted to masticatory, oral and perioral muscles. If reading would not be interrupted immediately at that point of time, a GTCS may develop (Koutroumanidis et al 1998).

The onset of reading epilepsy shows a median of 17 years, and usually the interictal EEG is completely inconspicuous in 80 percent of patients (Ferland et al. 2005). Epileptic discharges can only be recorded after provocation, frequently consisting in sharp-waves. In contrast to other subtypes of reflex epilepsy, seizures are specifically elicited by reading silently or aloud, respectively, particularly difficult or unusual texts (Panayiotopoulos 2012). Reading epilepsy may be predetermined by autosomal dominant inheritance.

A long delay until the correct diagnosis is made going along with significant implications concerning social, educational and professional life are common in these cases. When treated adequately, reading epilepsy has a favourable prognosis. Valproic acid, clonazepam, and levetiracetam have been reported to be effective in seizure control (ILAE 2010). However, with regard to our patient's age and her stated wish to become pregnant, we prescribed lamotrigine in the present case.

References

- Bickford et al.: Reading epilepsy: clinical and electroencephalographic studies of a new syndrome, *Trans Am Neurol Assoc* 81: 100-102, 1956
- Relazzo E et al.: Cortical triggers in generalized reflex seizures and epilepsies, *Brain* 128: 700-710, 2005
- Koutroumanidis M et al.: The variants of reading epilepsy, *Brain* 121: 1409-1427, 1998
- Panayiotopoulos CP: Reflex seizures and related epileptic syndromes, pp 39-42, Springer, 2012
- Report of the ILAE commission on classification and terminology: revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies, *Akt Neurol* 37: 120-130, 2010
- Steinlein O: Die Genetik der idiopathischen Epilepsien, *Biospektrum* 16: 16-18, 1999
- Wolf P: Epileptic seizures and syndromes, pp 67-73, John Libbey Eurotext Ltd., 1994

Experimentelle Untersuchung zur Biokompatibilität offener poriger metallischer Implantatstrukturen mit bioaktiver Kalzium-Titanat-Reaktionsschicht unter besonderer Berücksichtigung des Knochenaufbaus

Ergebnisse einer tierexperimentellen* Untersuchung

Lucie de Azevedo^{1,3}, Ursula Sommer^{2,3}, Reinhard Schnettler^{2,3}

¹ Bundeswehrkrankenhaus Hamburg

² Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH

³ Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Einleitung

Die Behandlung großer Trümmerfrakturen langer Röhrenknochen, verursacht z.B. durch Gewalteinwirkungen im Rahmen militärischer Kampfhandlungen, Hochrasanztraumen oder maligner Knochentumoren, erfordert mitunter autologe oder allogene Spenden biologischen Materials. Nicht immer lässt sich hierdurch der Defekt adäquat chirurgisch versorgen, sodass andere Knochenersatzmaterialien zum Einsatz kommen müssen. Nach wie vor sind allogene oder xenogene Fremdspenden, mit einem Infektions- und Tumorrisiko behaftet. Anzuwendende Sterilisationsverfahren mindern die biologische Wertigkeit (Osteokonduktion, -induktion, -genität, Biomechanik und -kompatibilität), was die Osteointegration erschwert oder gar verhindert. Andere Surrogate mit ausreichender biologischer Wertigkeit stehen bis heute nicht zur Verfügung.

Ob durch Beschichtung mit Kalziumtitanat funktionalisierte Implantate aus Titanlegierungen die Osteogenese stärker anregen als nicht funktionalisierte, sollte durch die vorgestellte Arbeit geprüft werden.

Material und Methoden

Bei 2 Gruppen zu je 12 adulten Merino-Landschafen wurden 10 x 12 mm große, zylindrisch geformte, offenporige (10 ppi) Titankörper (Ti-6Al-7Nb) in einen durch das Diamond-Bone-Cutting-System (DBCS) reproduzierbaren Defekt in die rechte mediale Femurkondyle (Abbildung 1) implantiert. Diese Scaffolds waren bei einer Gruppe mit einer Kalzium-Titanat-Reaktionsschicht funktionalisiert worden, um eine erhöhte Osteointegration und -konduktion zu provozieren. Zur Beurteilung aller 3 Phasen der Knochenheilung wurde eine Standzeit von 6 Monaten gewählt und eine polychrome Sequenzmarkierung mit Fluorochromen (intramuskulär verabreicht) vorgenommen (28. Tag: Tetracyclin, 105. Tag: Alizarin, 168. bzw. 175. Tag: Calcein;), was postmortal eine zeitliche Zuordnung der Osteointegration ermöglichte, ohne die Tiere vorzeitig zu euthanasieren (Abbildung 2). Nach Entnahme der Implantate erfolgte die Einbettung in Technovit®9100Neu und die Erstellung von Knochenschliffen. Zur Evaluation der Osteogenese erfolgten histologische, enzym- und immunhistochemische, histomorphometrische, molekularbiologische sowie biomechanische Untersuchungen.

* Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projektnr.: DFG AZ SCHN 976/1-2) gefördert; die Ethikkommission des Regierungspräsidiums Darmstadt hat den Versuchen mit Entscheidung vom 23.03.2011 mit dem Aktenzeichen V54-19c20/15- F31/31 zugestimmt.

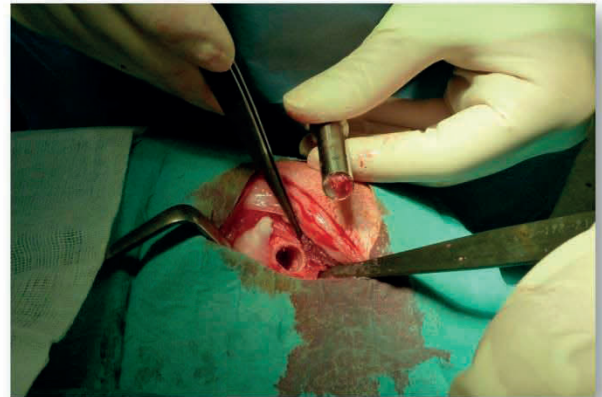


Abb. 1: Mit DBCS gesetzter Knochendefekt und Extractor; nach Entnahme des Knochenzylinders wurde das zylindrische Scaffold implantiert

Ergebnisse

Die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase (Abbildung 3) des neugebildeten Knochens innerhalb der Area of interest (AOI), die den Defektbereich zuzüglich eines Randbereiches von 100 µm umfasste, war bei den funktionalisierten Implantaten (2,77 %) geringfügig stärker als bei den unfunktionalisierten Präparaten (1,57 %). Die histomorphometrisch bestimmte Fläche des neugebildeten Knochens für das Fluorochrom Alizarin betrug bei den funktionalisierten Testobjekten im Mittel 2,2107 mm² gegenüber 1,9655 mm² bei den unfunktionalisierten. Auch die Menge neugebildeten Knochens war zwar bei funktionalisierten Implantaten (30,46 %) minimal größer als bei reinen Titan-Implantaten (24,73 %). Allerdings lieferte die

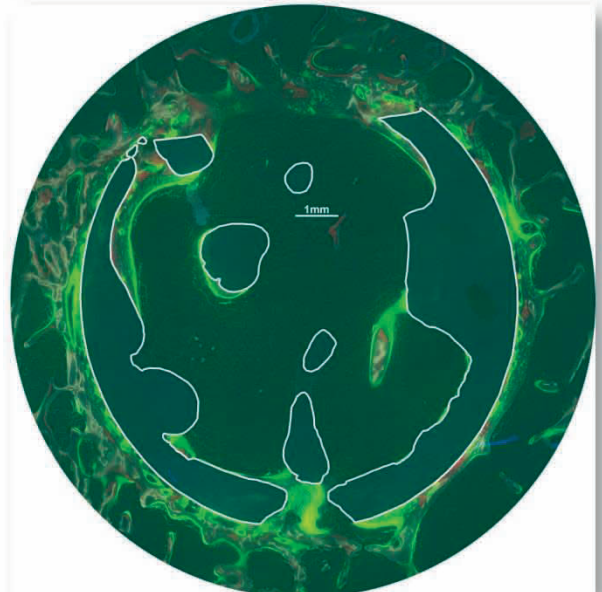


Abb. 2: Schaf „11 S4“, funktionalisiertes Implantat (weiß umrandet); die drei verschiedenen chromatischen Fluorochrome zeigen die Abfolge der Knochenneubildung im Lagerknochen: gelb für Tetracyclin, rot für Alizarin und grün für Calcein.

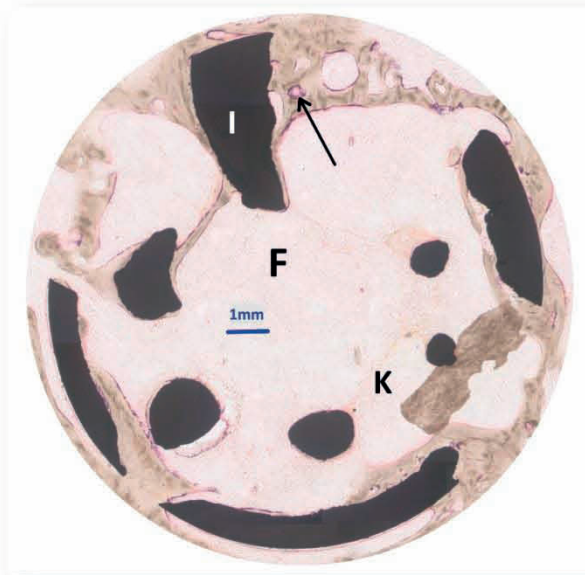


Abb. 3: Schaf „19 S3“, funktionalisiertes Implantat: Geflecht-knochen (K) ist durch die interkonnectierenden Poren des Implantats (I) zentripetal eingewachsen und schließt dieses in dieser Schliffebene fast vollständig ein. Im Zentrum des Defektes befindet sich neben Fettmark (F) ein Knochenareal mit deutlicher Enzymaktivität (Pfeil).

statistische Auswertung keine Signifikanz für die Unterschiede. Dies war auch bei Auswertung der Standardfärbung mit Toluidinblau der Fall.

Diskussion

Versuchsmodell

Ein wesentliches Ziel osteosynthetischer Operationen ist die Erzielung einer Primärstabilität (Übungsstabilität), um zeitnah eine postoperative Mobilisation des Patienten zu ermöglichen, so die Osteogenese anzuregen und einer Atrophie entgegenzuwirken. Deshalb wurde ein gegossenes, offenporiges und zylindrisches Implantat aus einer Titanlegierung (Ti6Al7Nb) gewählt. Durch die Geometrie konnte die Reproduzierbarkeit der Defektgröße mittels des Diamond-Bone-Cutting-Systems (DBCS, Firma Biomet®, Darmstadt) gewährleistet werden.

Da die Osteoprogenitorzellen über OPN (Osteoprogenitorprotein) und BSP (Bone-specific Protein) durch L-Typ-Kalzium-Kanäle und die Kalzium-abhängige Proteinkinase (CAMK2) freies Kalzium binden und zu Osteoblasten differenzieren, wurden die funktionalisierten Implantate mit einer Kalzium-Titanat-Reaktionsschicht versehen. Ziel war es, eine erhöhte Adhäsion spezifischer Knochenzellen zu erreichen, um so die Biokompatibilität zu erhöhen.

Um bei einer Evaluation in vivo auf den Menschen übertragbare Daten zu erhalten, fiel die Wahl auf ausgewachsene Merino-Landschafe. Biokompatibilität, Inflammations- und Osteonintegrationsverhalten entsprechen bei diesen weitestgehend denen des humanen Knochens. Oviner Knochen ist daher besser geeignet als z.B. Kleintierknochen. Weiter sind Stoffwechselprozesse im ausgewachsenen Land-schaf mit dem des Patientenkollektivs vergleichbar, in welchem die Implantate Anwen-

dung finden sollten. Das gilt auch für Gewichts-Knochen-Relation, Knochenstruktur sowie Blut-, Immun- und Lymphsystem.

Die sekundäre (über Bildung eines Knorpels) Defektheilung eines frakturierten Knochens wird in drei Phasen – Akutphase, Reparationsphase und Remodelling – eingeteilt. Nach der zweiten Phase (Reparation) wird der Geflecht-knochen kalzifiziert. Die Bildung des Lammellenknochens definiert das Remodelling und kann individuell unterschiedlich zwischen 4 Monaten und mehreren Jahren andauern. Die Anreicherung des kurz vor der Präparatengewinnung verabreichten Fluorochroms Alizarin ließ erkennen, dass das Remodelling nach 6 Monaten noch nicht vollends abgeschlossen war.

Bewertung der Ergebnisse

Im Vergleich der Ergebnisse zeigten die Kalzium-Titanat-Implantate bei der histomorphometrischen Messung, der Aktivität der alkalischen Phosphatase, der Toluidinblau-Färbung des neugebildeten Knochens, den Fluoreszenzen sowie den molekularbiologischen und biomechanischen Testungen jeweils eine minimal erhöhte Knochenneubildung, die jedoch vornehmlich auf die Randbereiche des Implantates konzentriert war, während das Innere des Defektes weitgehend knochenfrei blieb. Außerdem fand sich bei beiden Testgruppen eine mit Bindegewebe oder Fettmark gefüllte Spaltbildung am Interface. Mögliche Erklärungen dafür sind:

Bei der Herstellung der zylindrischen Rotationskörper wurden diese in der Drehmaschine nach einem Ätzzvorgang mit Flusssäure geformt. Prozessbedingt war der Ätzzvorgang an der gedrehten äußeren Oberfläche weniger effektiv als im Inneren. Dies scheint dort zu einer erniedrigten Zelladhäsion geführt zu haben.

Des Weiteren konnten die ursprünglich geplanten 20 – 30 ppi dichten, Spongiosa-ähnlichen Strukturen, im Gießvorgang nicht vollends realisiert werden, sodass die Zellmigration gehemmt wurde.

Das zu testende Material hatte einen höheren Elastizitätskoeffizient (Titan 105 kN/m²) als spongiöser Knochen (18 kN/m²). Der Knochen „sah“ damit keine mechanische Veranlassung, in den durch das Implantat stabilisierten Defekt einzuwachsen (Wolff-Transformationsgesetz).

Fazit

Eine Funktionalisierung gegossener offenporiger Titanimplantate durch eine Calcium-Reaktionsschicht erhöht im Großtier-versuch gegenüber unfunktionalisierten Surrogaten die Osteointegration nicht.

Klinische und wehrmedizinische Relevanz der optimierten Behandlung von Knochendefekten machen die weitere Forschung zur Entwicklung eines idealen Surrogats erforderlich. Bis es zur Verfügung steht, bleibt der autologe Knochenersatz Goldstandard.

Bildquellen: L. de Azevedo, Hamburg

Für die Verfasser:

Oberstabsarzt Lucie de Azevedo
Bundeswehrkrankenhaus Hamburg
Email: luciedeazevedo@gmx.de

Literatur beim Verfasser

10. Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6506-5



9 783835 196506 5